

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA FORMATION OSSEUSE SOUS L'INFLUENCE DE L'APOLIPOPROTÉINE D

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
CÉLINE SIGNOR

JANVIER 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Si vous lisez ceci, force est de croire que j'ai terminé ma maîtrise.

Je n'aurais pas pu y arriver sans un bon nombre de personnes, que je tiens à remercier de tout mon cœur. Leurs noms ne sont peut-être pas tous cités ici mais le parcours laborieux de deux ans, décrit dans les prochaines 70 pages, en est marqué. Cela va sans dire que je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, Robert Moreau, de m'avoir donné la chance de faire de la recherche mais surtout pour sa patience et son implication dans ce projet à tous les niveaux. Sans oublier ceux qui m'ont fait apprécier les heures de travail en laboratoire, même quand les résultats n'étaient pas au rendez-vous : Véronique Arseneau, Véronique Gaudreault, Abdallah Fallah, Olha Kerkhova, Jérôme Lizotte, Corine Martineau, Rachel Pierre, Marine Regnier, Hugo Roméro et Jaime Sanchez Dardon. Je remercie aussi les collaborateurs au projet qui m'ont, entre autres, révélé les secrets de l'apoD; je pense à Éric Rassart, Ouafa Nagyb et Maxime Thiery.

Je ne peux parler des ces deux ans sans parler de la grève étudiante de 2012, qui a su renforcer mon désir d'étudier, d'apprendre mais aussi mon engagement dans tous mes projets. Ce parcours n'aura pas été sans embûches, je remercie mes ami(e)s qui m'ont soutenue, Catherine Roch, Lydia Roy-Simard, Charles-Anthony Villeneuve, Guillaume Auger, Sandra Joppé et de nouveau Hugo et Marine, pour n'en citer que quelqu'uns.

Finalement, je remercie mes parents et ma soeur, qui m'ont toujours encouragée dans mon parcours académique et qui me donnent un support infini.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	VII
RÉSUMÉ	XI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Les propriétés de l'apolipoprotéine D	3
1.1.1 Structure de la protéine.....	3
1.1.2 Structure du gène et régulation de l'expression.....	4
1.1.3 Distribution tissulaire	5
1.2 Les rôles de l'apolipoprotéine D	6
1.3 Le métabolisme osseux et l'apolipoprotéine D	8
1.3.1 Le tissu osseux.....	8
1.3.2 Les cellules de l'os	11
1.3.3 La différenciation des ostéoblastes.....	12
1.3.4 Le métabolisme osseux	13
1.3.5 L'ostéoporose	16
1.3.6 L'apolipoprotéine D et le métabolisme osseux	17
CHAPITRE II : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	21
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE	23
3.1 Culture cellulaire	23
3.1.1 Lignée cellulaire murine.....	23
3.1.2 Lignées cellulaires humaines.....	24
3.1.3 Cultures primaires murines.....	24
3.2 Traitements des cultures cellulaires.....	25
3.3 Analyse de l'expression génique par RT-PCR	26

3.4	Essais de viabilité et de prolifération	27
3.5	Analyse de la différenciation ostéoblastique	29
3.6	Analyses statistiques	30
CHAPITRE IV : RÉSULTATS		31
CHAPITRE V : DISCUSSION.....		45
5.1	Modulation de l'expression de l'apoD.....	45
5.2	L'apoD et les ostéoblastes	49
5.3	L'apoD dans les cultures primaires.....	52
5.4	L'apoD dans les lignées humaines.....	54
CHAPITRE VI : CONCLUSION		55
APPENDICE A		57
BIBLIOGRAPHIE		59

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation de la structure de l'apoD humaine	4
1.2 Structure d'un os long.....	10
1.3 Remodelage osseux	14
1.4 Représentation schématique de la régulation du remodelage osseux.....	15
1.5 Analyse morphométrique de la portion trabéculaire de fémurs de souris femelles et mâles WT et KO-apoD.	18
1.6 Analyse morphométrique du fémur de souris femelles WT et KO-apoD.	19
4.1 Expression génique de l'apoD selon différents traitements réalisés sur des cultures d'ostéoblastes MC3T3.	32
4.2 Expression génique de l'apoD par des cultures d'ostéoblastes MC3T3 en condition de sevrage.	34
4.3 Expression génique de l'apoD selon la confluence des cultures d'ostéoblastes MC3T3.....	37
4.4 Expression de l'apoD à différents stades de différenciation des ostéoblastes MC3T3.....	39
4.5 Prolifération des ostéoblastes MC3T3 suite à l'ajout d'apoD dans le milieu de culture.	40
4.6 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline suite à l'ajout d'apoD.	41
4.7 Prolifération des cellules de la moelle osseuse des souris WT et apoD-/-	42
4.8 Expression génique de l'apoD par des cultures de lignées d'ostéoblastes MG-63 et U2OS.	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Séquences des amorces utilisées (de la compagnie Operon et Invitrogen)	27

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

α : alpha

β : bêta

μ : micro

α -MEM : «alpha Minimum Essential Medium»

ALP : Phosphatase alcaline

ADN : acide désoxyribonucléique

ApoD : Apolipoprotéine D

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : « American type culture collection »

BMP : « Bone Morphogenetic Protein »

BrdU : Bromodéoxyuridine

BSA : albumine sérique de bovin

CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux

DMSO : diméthylsulfoxyde

ERK : « extracellular-signal-regulated kinase »

FBS : sérum bovin fœtal

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HDL : Lipoprotéine de haute densité

IP : iodure de propidium

JNK : « c-Jun N-terminal kinase »

kDa : kiloDalton

KO : Knock-Out. L'appellation «KO-*apoD*» sera utilisée pour désigner des souris homozygotes *ApoD*^{-/-}, par souci de simplicité.

Kpb : kilopaire de bases

LCAT : lécithine cholestérol acyltransférase

M-CSF : « macrophage-colony stimulating factor »

MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »

MEM : «Minimum Essential Medium»

MSC : cellule souche mésenchymateuse

MTT : microtiter tetrazolium

OPG : ostéoprotégérine

PBS : tampon phosphate salin

PCR : polymérase en chaîne

PDGF : « platelet-derived growth factor »

PNP : p-nitrophényl

PNPP : p-nitrophénylphosphate

PTH : parathormone

RANKL : « Receptor Activator of NFκB Ligand »

RT : « Reverse Transcriptase » (transcriptase inverse)

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEM : écarts à la moyenne

TGF-β : « Transforming Growth Factor-β »

UV : ultra-violet

WT : « Wild-Type »

RÉSUMÉ

L'os est un tissu dynamique qui possède la particularité d'être en remodelage perpétuel. En effet, le maintien de la masse osseuse repose sur un équilibre entre la dégradation de la matrice minéralisée par les ostéoclastes et la formation d'une nouvelle matrice par les ostéoblastes. Une rupture de l'équilibre en faveur de la dégradation cause une baisse de la densité osseuse menant au développement de l'ostéoporose, pathologie qui touche plus de deux millions de personnes au Canada. Il a été récemment découvert qu'une déficience en apolipoprotéine D (ApoD) chez les souris favorise un phénotype osseux s'apparentant à l'ostéoporose. En effet, les souris femelles déficientes pour l'*apoD* (KO-*apoD*) ont une densité osseuse significativement plus faible que les souris de type sauvage (WT). L'ApoD est une glycoprotéine de 29 kildalton (kDa) faisant partie de la famille des lipocalines, des protéines multi-ligands pouvant transporter diverses petites molécules hydrophobes. Le phénotype osseux observé chez les souris KO-*apoD* semble attribuer un rôle à cette protéine dans la régulation du remodelage osseux. Néanmoins, l'expression de l'*ApoD* n'a été jusqu'à présent que peu étudiée dans les cellules osseuses. En effet, si son expression a été détectée dans les ostéoblastes et les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine, l'analyse de la régulation de son expression n'a pas été approfondie et s'avère nécessaire afin de cerner son rôle dans le métabolisme osseux. Ainsi le présent projet visait à étudier l'expression génique de l'*apoD* et son rôle dans un modèle cellulaire murin, la lignée ostéoblastique MC3T3. La régulation de l'expression génique de l'*apoD* par différents traitements, incluant la différenciation ostéoblastique, a été analysée par transcription inverse (RT) suivie de réactions de polymérisation en chaîne (PCR). L'effet de l'ajout d'APOD au milieu de culture sur la prolifération des cellules a été testé par analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux et par analyse de la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) par incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU). Aussi, l'effet de l'APOD sur la différenciation ostéoblastique a été étudié par dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP). Finalement la prolifération des cellules en culture primaire issues d'os de souris KO-*apoD* a été comparée à celle des cellules issues d'os de souris WT. Nos résultats indiquent une diminution de l'expression génique de l'*apoD* chez les cellules MC3T3 exposées à l'acide ascorbique durant 24 heures (h). Un traitement des cellules au glucocorticoïde était sans effet sur l'expression génique de l'*apoD* et l'exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène tendait à diminuer son expression génique. De plus, l'expression génique de l'*apoD* des cellules MC3T3 était augmentée dans des conditions de culture favorisant un arrêt de prolifération, soit la privation de sérum ou par l'inhibition de contact suite à l'atteinte de la confluence. De même, les conditions de culture favorisant la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3 ont augmenté l'expression de l'*apoD*. Afin d'étudier l'effet de la protéine en circulation, nous avons ajouté de l'APOD au milieu de culture des cellules MC3T3 et analysé ses effets sur les fonctions cellulaires. Cet ajout d'APOD a augmenté le

pourcentage des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, sans toutefois que la réplication de l'ADN ne soit affectée et a augmenté l'activité ALP. Par la suite, nous avons analysé l'influence de l'absence d'expression de l'*apoD* sur la prolifération cellulaire. Nos résultats ont indiqué que la prolifération des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris KO-*apoD* était réduite comparée à celle d'ostéoblastes provenant de souris WT. Finalement, nous avons mis en évidence l'expression génique de l'*APOD* dans les lignées ostéoblastiques humaines U2OS et MG63, ce qui ouvre de nouvelles perspectives d'étude quant à son rôle dans le métabolisme osseux chez l'humain. Ainsi, l'ApoD semble impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques, et nos résultats sont en accord avec la diminution de la masse osseuse chez les souris déficientes en *apoD*.

INTRODUCTION

Bien qu'elle soit classée dans la famille des apolipoprotéines, l'APOD/ApoD est une glycoprotéine qui diffère des autres apolipoprotéines par sa distribution tissulaire et sa structure protéique. Ainsi, on la retrouve faiblement exprimée dans le foie et les intestins, qui sont pourtant les sites majeurs de synthèse des autres apolipoprotéines, alors qu'on la détecte principalement dans le système nerveux central chez la souris et dans plusieurs organes comme les glandes surrénales, le pancréas et les poumons chez l'humain (Drayna et al., 1986; Rassart et al., 2000; Séguin et al., 1994). De plus, sa séquence d'acides aminés s'apparente plus à celle des lipocalines qu'à celle des apolipoprotéines (Rassart et al., 2000). L'APOD/ApoD présente une structure sous la forme de barillet β , typique des lipocalines, et comporte en plus des résidus hydrophobes (Drayna et al. 1986). Cette dernière caractéristique lui confère la propriété de se lier à des petites molécules hydrophobes, telles que l'acide arachidonique et les hormones stéroïdes, ce qui en fait une protéine dite multi-ligand. Au niveau génique, le promoteur du gène encodant l'ApoD comporte de multiples éléments de réponse à des facteurs allant du stress jusqu'aux hormones stéroïdes (Lambert et al., 1993). En accord avec la présence de ces éléments de réponse, l'*apoD* est surexprimée dans les cellules nerveuses lors de stress oxydatif, et il est proposé que cette augmentation d'expression contribuerait à protéger les cellules des dommages causés par celui-ci

(Ganformina et al., 2008). De plus, une relation inverse entre la prolifération cellulaire et l'expression de l'*apoD* a été rapportée. En effet, l'expression de l'*apoD* est augmentée dans les cellules sénescents et/ou non prolifératives (Do Carmo et al., 2007; Provost et al., 1991). Ces travaux ont principalement été menées avec des cellules nerveuses et des fibroblastes, dans lesquelles l'*apoD* est fortement exprimée chez la souris. Récemment, les travaux de notre laboratoire, en collaboration avec le laboratoire d'Éric Rassart, ont mis en évidence que les souris femelles déficientes (KO) pour l'*apoD* avaient une masse osseuse réduite lorsque comparée à celle des souris de type sauvage (WT) (données non publiées). Cela laisse supposer que l'ApoD a un rôle dans la régulation du métabolisme osseux. Toutefois, l'étude de l'expression de l'*apoD* dans les cellules osseuses en est à ses prémises. Le présent projet avait pour objectif général d'étudier l'expression génique de l'*apoD* ainsi que son rôle dans les ostéoblastes.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les propriétés de l'apolipoprotéine D

1.1.1 Structure de la protéine

L'APOD/ApoD est une protéine composée d'une chaîne de 189 acides aminés, incluant un peptide signal de 20 acides aminés hydrophobes. Après clivage du peptide signal, la protéine mature est ainsi formée de 169 acides aminés (Drayna et al., 1987a). Le poids moléculaire de l'APO/ApoD varie en fonction de sa glycosylation, celle-ci représentant en effet environ 18% de sa masse (Drayna et al., 1986). Son poids moléculaire peut varier de 18 kDa, pour la séquence d'acides aminés seule, à 32 kDa selon l'estimation faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) (Drayna et al., 1986; Weech et al., 1991).

De part sa séquence en acides aminés, l'APOD/ApoD s'apparente plus aux lipocalines qu'aux autres apolipoprotéines (Drayna et al., 1986; Flower, 1996; Weech et al., 1991). De plus, sa structure tertiaire, en forme de barillet bêta ouvert à son sommet et fermé à sa base (Figure 1.1), rappelle aussi celle de la famille des lipocalines (Drayna et al., 1986; Yang et al., 1994). Cependant, l'APOD/ApoD diffère de celles-ci par la présence de résidus hydrophobes à l'extrémité ouverte. Ces résidus forment un site de liaison pour les petites molécules hydrophobes (Drayna et al., 1986; Peitsch et Boguski, 1990).

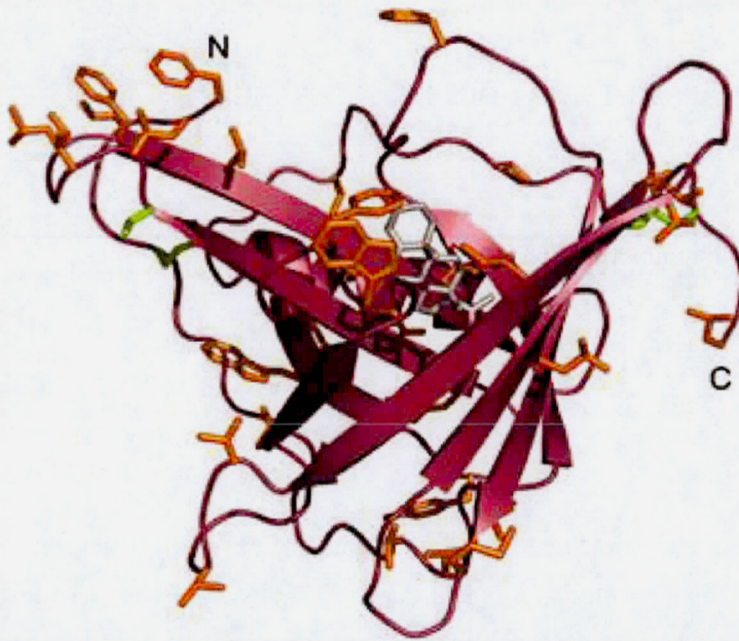


Figure 1.1 Représentation de la structure de l'APOD humaine

La structure en forme de barillet est représentée en rose, les surfaces hydrophobiques sont présentées par des bâtonnets oranges et les résidus cystéine en vert. Les extrémités N-terminale (glycosylée) et C-terminale sont anotées. Tirée de Eichinger et al. (2007).

1.1.2 Structure du gène et régulation de l'expression

Le gène codant pour l'APOD est situé dans la région p14.1 du chromosome 3 chez l'humain, tandis que celui de la souris est situé sur le chromosome 6 (Drayna et al., 1987a; Rassart et al., 2000; Weech et al., 1991). L'acide ribonucléique messager (ARNm) transcrit du gène *APOD/apoD* est composé de 815 nucléotides, comprenant cinq exons étalés sur 20 kilopaires de bases (kpb) d'acide désoxyribonucléique (ADN) (Drayna et al., 1987 b).

Le promoteur du gène présente différentes séquences agissant comme des éléments de réponse aux hormones stéroïdes et au sérum (Do Carmo et al., 2002; Lambert et al., 1993). En accord avec la présence de ces éléments de réponse, l'expression de l'*APOD* dans les lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate est modulée par les hormones stéroïdes tels les androgènes, les œstrogènes et les glucocorticoïdes (Simard et al., 1990; 1991; 1992).

De plus, l'expression de l'*APOD/apoD* est augmentée dans les cellules fibroblastiques sénescents et non prolifératives (Provost et al., 1991) et elle est aussi fortement augmentée dans les fibroblastes soumis à un arrêt de prolifération causé par la privation de sérum (Do Carmo et al., 2002, 2007). Par ailleurs, l'expression de l'*apoD* est stimulée par différentes conditions de stress, telles que l'exposition aux rayons ultra-violet (UV) et le stress oxydatif (Do Carmo et al., 2007). Finalement, la différenciation de cellules humaines de cancer du sein induite par l'ajout d'acide rétinoïque ou de 1,25-dihydroxyvitamine D3 (vitamine D) entraîne une augmentation de l'expression de l'*APOD* (Lopez-Boado et al., 1994, 1996). Il est à noter que la différenciation cellulaire est généralement associée à un arrêt de la prolifération cellulaire.

1.1.3 Distribution tissulaire

L'ARNm de l'*APOD/ApoD* a été détecté dans les tissus de plusieurs mammifères tels que la souris, le rat, le lapin, le singe et l'humain (Rassart et al., 2000). Cependant, contrairement aux autres apolipoprotéines qui sont principalement exprimées dans le foie et les intestins, l'*APOD/ApoD* n'est généralement que faiblement exprimée dans ces tissus. De plus, la distribution tissulaire de l'expression de l'*APOD/apoD* diffère selon l'espèce. Ainsi chez l'humain, le singe et le lapin, on retrouve une expression importante de l'*APOD* dans le cerveau, les glandes surrénales, les reins, le pancréas, le placenta, la rate, les poumons, les ovaires, les testicules et les nerfs périphériques (Drayna et al., 1986; Rassart et al., 2000). Par contre, chez la souris et le rat, l'*apoD* est principalement exprimée dans le système nerveux central, soit dans la moelle épinière, le cervelet et le cerveau (Rassart et al., 2000; Séguin et al., 1994).

1.2 Les rôles de l'apolipoprotéine D

L'APOD a d'abord été identifiée comme une protéine associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (McConathy et Alaupovic, 1973). Par son association avec la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), présente à la surface des HDL, l'APOD s'est vu attribué un rôle de transporteur du cholestérol des tissus périphériques au foie (Spreyer et al., 1990). Le cholestérol était alors considéré comme un des principaux ligands de l'APOD (Drayna et al., 1986). Par la suite, Balbin et collègues ont rapporté que cette protéine était la composante principale des fluides kystiques mammaires (Balbin et al., 1990) et l'ont initialement nommée GCDFP-24. Elle était retrouvée à de plus grandes concentrations dans les fluides kystiques de tumeurs bénignes fortement différenciées comparativement aux concentrations dans les tumeurs malignes peu différenciées. Elle représente ainsi un marqueur biologique pour évaluer la malignité du cancer de sein. Un niveau d'expression similaire en fonction de la malignité des tumeurs a aussi été retrouvé dans certains cancers de la prostate (Aspinall et al., 1995). Sa première caractérisation a démontré qu'elle liait la progestérone avec une grande affinité, ainsi que la prégnénolone (Balbin et al., 1990; Dilley et al., 1990). Avec une affinité moindre, l'APOD peut aussi lier d'autres types de progestines ainsi que des androgènes, avec des coefficients de dissociation qui suivent l'ordre décroissant suivant: prégnénolone, progestérone, pregnandione, androgènes puis œstrogènes. Considérant ses caractéristiques communes à la famille des lipocalines, connues pour leur rôle dans le transport de petites molécules hydrophobes, un rôle dans le transport de ces hormones stéroïdes dans les glandes mammaires a été attribué à l'APOD (Balbin et al., 1990; Dilley et al., 1990).

La modélisation moléculaire de la glycoprotéine a ensuite démontré que des composés dérivés de l'hème, telle que la bilirubine, seraient des ligands physiologiques plus probables que le cholestérol et ses dérivés (Peitsh et Boguski, 1990). La bilirubine se lie à l'APOD selon un ratio 0.8 : 1, ce qui expliquerait l'affinité des HDL pour la bilirubine (Goessling et Zucker, 2000; Peitsh et Boguski, 1990). Finalement, l'acide arachidonique a été identifiée comme étant le ligand physiologique le plus probable de l'APOD, montrant une affinité 20 fois supérieure à celle de l'apoD pour la progestérone (Morais-Cabral et al., 1995). Ainsi, il a

été proposé que l'APOD contribuerait au transport de l'acide arachidonique et ainsi, modulerait ses fonctions dans la conversion du cholestérol en esters de cholestérol, et la synthèse des prostaglandines (Morais-Cabral et al., 1995).

Des études sur les protéines homologues à l'ApoD chez la drosophile (désignée Glial Lazarillo) et chez la plante (nommée AtTIL) ont contribué à lui conférer un rôle dans la résistance au stress. Lorsque soumis à un stress oxydatif, l'absence d'ApoD chez ces deux modèles d'étude diminue leur durée de vie (Charron et al., 2008; Walker et al., 2006). Un même rôle de protection contre le stress a été démontré chez les souris KO-*apoD*. Lorsque comparé à des souris WT, la durée de vie de celles-ci était diminuée de plus de 26% suite à une exposition journalière au paraquat qui induit un stress oxydatif (Ganformina et al., 2008), suggérant une implication de l'ApoD dans la protection et le contrôle de la peroxydation des lipides. En effet, les souris KO-*apoD* présentaient un taux de peroxydation d'au moins 33% plus élevé que celui des souris WT. Les niveaux de carbonylation des protéines, généralement augmentés lors de l'exposition au paraquat, n'étaient cependant pas différents entre les souris KO-*apoD* et WT (Ganformina et al., 2008). Par ailleurs, les souris transgéniques surexprimant l'APOD humaine dans le cerveau voyaient leur durée de vie augmentée de plus de 28% lorsqu'elles étaient soumises à des doses élevées de paraquat. Il faut noter que l'expression de l'APOD endogène dans le cerveau augmentait dans cette situation de stress oxydatif (Ganformina et al., 2008). De même, ces souris avaient un taux de survie aux encéphalites aiguës par infection au coronavirus humain OC43 qui était trois fois plus élevé que celui des souris WT (Do Carmo et al., 2008).

Dans le système nerveux périphérique, l'ApoD est produite par les cellules du neurilemme ou les cellules fibroblastiques. Dans ce contexte, il semble que l'ApoD ait un rôle dans la régénération des nerfs endommagés en participant au transport du cholestérol et de ses esters et ainsi dans la remyélinisation (Rassart et al., 2000). Dans le système nerveux central, ce sont les astrocytes et les oligodendrocytes qui produisent l'ApoD. Elle y aurait un rôle dans le transport et l'accumulation des hormones stéroïdes, telles que la progestérone et la prégnénolone dans le cerveau des humains et des rats, mais aussi dans les nerfs sciatiques. Par son association avec la LCAT, l'ApoD contribuerait à l'esterification du cholestérol pouvant avoir un effet dans la réinnervation et la remyélinisation (Rassart et al., 2000).

L'APOD est aussi surexprimée dans plusieurs pathologies sans que son rôle ne soit encore clairement déterminé. Dans le système nerveux, son expression est accrue dans les fluides encéphaliques de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick, d'Alzheimer, de la méningo-encéphalite, du syndrome de Guillain-Barré ainsi que chez les patients atteints de démence, schizophréniques ou ayant eu un accident vasculaire cérébral (Rassart et al., 2000; Terrisse et al., 1998).

1.3 Le métabolisme osseux et l'apolipoprotéine D

Bien que l'ApoD soit principalement exprimée dans le système nerveux chez les souris et rats, elle a aussi été détectée dans le tissu osseux, où elle est exprimée notamment par les ostéoblastes (Ishii et al., 2005; Sasaki et al., 2009). Ceux-ci sont des cellules particulièrement importantes pour le maintien de la santé des os, puisqu'ils assurent la formation et la minéralisation de la matrice osseuse, et orchestrent l'activité des ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption du tissu osseux.

1.3.1 Le tissu osseux

Le squelette des vertébrés comporte plusieurs types d'os, à savoir les os longs et les os courts, de formes plates, ou irrégulières. Les premiers, plus nombreux, contiennent deux types de tissu osseux: l'os compact (lamellaire ou cortical) et l'os spongieux (ou trabéculaire), tandis que les trois autres se composent principalement d'os spongieux (Figure 1.2). Ils sont tous recouverts d'une membrane, le périoste, composé de tissu conjonctif, parsemé d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. L'os compact constitue 80% de la masse totale des os et est formé d'unités structurales complexes appelées ostéons. Ceux-ci sont en forme de cylindre creux, composés de lamelles superposées séparées par des lacunes et incluant un canal central permettant les connexions nerveuses et vasculaires (Marieb, 2005). L'os

spongieux est formé de travées, désignées trabécules, formant une structure en nid d'abeilles qui confère l'élasticité de l'os et sa résistance face aux contraintes subies. Ces trabécules sont composées de lamelles irrégulières où sont enchassés des ostéocytes, reliés entre eux par des canalicules. Les cavités formées par cette structure trabéculaire accueillent la moelle osseuse, rouge ou jaune (Marieb, 2005).

Qu'il soit spongieux ou compact, le tissu osseux est composé d'une partie organique et d'une partie inorganique. La première inclut la matrice dite ostéoïde, formée de protéines globulaires (ostéonectine, ostéopontine et ostéocalcine) et de protéines fibreuses (principalement les fibres de collagène de type I). Sécrétées par les ostéoblastes, ces protéines sont la base de la matrice osseuse et sont essentielles à la flexibilité de l'os. La partie inorganique, composée principalement de cristaux d'hydroxyapatite, assure la rigidité et la dureté de l'os. Constituant 65% de la matrice osseuse, ces sels minéraux composés de phosphates de calcium forment des cristaux qui entourent les fibres de collagène de la matrice organique, ce qui donne la rigidité à l'os (Marieb, 2005).

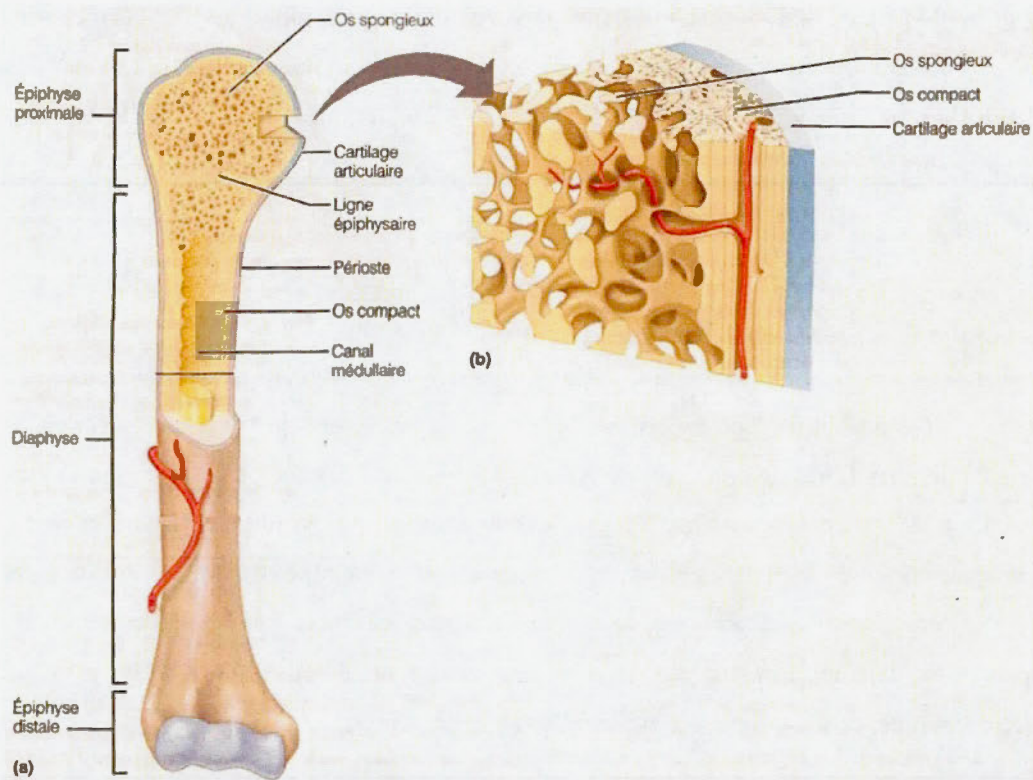


Figure 1.2 Structure d'un os long

a) Coupe longitudinale montrant l'intérieur de la diaphyse et l'extrémité proximale de l'épiphyse d'un humérus. Celui-ci comprend deux épiphyses composées principalement d'os spongieux, séparés par la diaphyse, composée d'os compact. Celle-ci est recouverte de périoste et comprend un canal médullaire contenant la moelle (rouge ou jaune). En b) Vue tridimensionnelle de l'os spongieux et de l'os compact de l'épiphyse proximale en a). L'os spongieux est formé de travées en structure de nid d'abeilles, tandis que l'os compact est formé d'ostéons, en forme de cylindre creux et composés de lamelles superposées séparées par des lacunes et incluant un canal central permettant les connexions nerveuses et vasculaires. Tirée de Marieb (2005).

1.3.2 Les cellules de l'os

Le maintien de la structure osseuse est assuré par les différentes cellules nommées précédemment, à savoir les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse, les ostéoblastes qui assurent sa formation et les ostéocytes.

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (50 à 100 micromètres de diamètre) multinucléées, issues de la fusion de précurseurs d'origine hématopoïétique. L'ostéoclaste mature est une structure polarisée, ce qui lui permet d'adhérer à la matrice osseuse via une zone de sa membrane en bordure de brosse. Cette structure membranaire délimite un micro-compartiment étanche, aussi appelé lacune de Howship, dans lequel s'effectue l'activité de résorption osseuse. L'ostéoclaste induit une acidification de la lacune via l'activité de pompes à protons, ce qui contribue à la dissolution de la phase minérale. Aussi, il sécrète des enzymes protéolytiques qui dégradent la phase organique (Meunier et al., 2005).

Une fois la matrice dégradée, les ostéoblastes, provenant de cellules souches mésenchymateuses (MSC), vont envahir la lacune de résorption et entreprendre la formation d'un nouveau tissu osseux. Ces cellules, plus petites et cuboïdales, produisent les constituants de la matrice osseuse (comprenant des protéines globulaires telles que l'ostéonectine, l'ostéopontine et l'ostéocalcine, ainsi que des protéines fibreuses, principalement les fibres de collagène) et sont responsables de sa minéralisation. Ils vont ainsi permettre le dépôt de collagène de type I, principal composant d'une nouvelle matrice ostéoïde (non calcifiée), qui sera ensuite minéralisée à l'aide de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), enzyme aussi synthétisée par les ostéoblastes (Meunier et al., 2005). À la fin de leur activité de synthèse, une partie des ostéoblastes entreront en apoptose tandis que certains seront englobés dans les lamelles de la matrice osseuse et deviendront des ostéocytes. Ceux-ci cesseront leur activité de formation osseuse mais demeureront actifs métaboliquement, tout en étant reliés entre eux via des canalicules, permettant ainsi le passage des nutriments et des déchets. Les ostéocytes participent ainsi au maintien de la matrice osseuse et vont permettre la détection des microlésions du tissu osseux et ainsi un certain contrôle du remodelage (Franz-Odentaa et al., 2005; Marieb, 2005).

1.3.3 La différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées provenant de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les MSC peuvent aussi se différencier en chondrocytes, en adipocytes, en fibroblastes ou en myoblastes (Ishii et al., 2005). L'engagement de ces cellules dans une voie de différenciation spécifique est induit par des facteurs de croissance en circulation et des facteurs de transcription. Dans le contexte de la différenciation en ostéoblastes, les principaux éléments sont les BMP et le facteur de transcription *Cbfa1/Runx2*. Les BMP sont aussi des facteurs locaux produits par les ostéoblastes qui augmentent l'expression de *Cbfa1/Runx2* dans les précurseurs ostéoblastiques, principalement BMP-2 (Chen et al., 2012). Ils font partie de la famille des TGF- β qui stimulent la prolifération des pré-ostéoblastes ainsi que la formation osseuse, par la stimulation de la production de collagène de type I et d'ostéopontine. La famille de facteurs hedgehog (Sonic et Indian) interagit aussi avec les BMP dans la régulation de la différenciation ostéoblastique (Yamaguchi et al., 2000). Le facteur de transcription *Cbfa1/Runx2* de la famille du domaine runt apparait essentiel à la différenciation ostéoblastique (Komori, 2006) puisque la prolifération et la différenciation des ostéoblastes sont inhibées chez les souris déficientes en ce facteur, et que ces souris se retrouvent avec un squelette formé uniquement de chondrocytes et de cartilage (Chen et al., 2012; Komori et al., 1997).

La différenciation des ostéoblastes comporte deux phases principales : une phase de prolifération des précurseurs exprimant les gènes précoces tels que le récepteur de la PTH et l'ALP, suivie d'une phase de maturation cellulaire caractérisée par l'expression des gènes responsables de la production de la matrice osseuse, tels que le collagène de type I et l'ostéopontine et des gènes tardifs de minéralisation (sialoprotéine osseuse et ostéocalcine) (Bilezikian et al., 2002).

1.3.4 Le métabolisme osseux

Le maintien d'une masse osseuse stable et fonctionnelle est assuré par un remodelage osseux perpétuel. Ce processus est divisé en quatre phases, représentées dans la figure 1.3: l'activation des ostéoclastes, la résorption osseuse, l'inversion des types cellulaires et la formation osseuse (Meunier et al., 2005). Les ostéoclastes proviennent de précurseurs mononucléés hématopoïétiques dont la différenciation en pré-ostéoclastes et l'activation sont régulées par trois facteurs principaux : le « Receptor Activator of NFκB Ligand » (RANKL), le « macrophage-colony stimulating factor » (M-CSF) et l'ostéoprotégérine (OPG). Ces facteurs sont respectivement présents à la surface des ostéoblastes ou sécrétés par ceux-ci. La liaison du M-CSF à son récepteur c-Fms situé à la surface des précurseurs d'ostéoclastes induit la transition de ceux-ci en pré-ostéoclastes. Ils présentent alors à leur surface le récepteur RANK dont la liaison avec son ligand RANKL, à la surface des ostéoblastes, provoque la fusion des pré-ostéoclastes menant à la formation d'un ostéoclaste multinucléé mais encore inactif pour effectuer la résorption. Celui-ci sera finalement activé par une liaison RANK/RANKL (Khurana, 2009) et débutera son activité de résorption. Cette étape d'activation des ostéoclastes est régulée par les ostéoblastes qui sécrètent aussi l'OPG, un récepteur soluble qui se fixe au RANKL et l'empêche ainsi de se lier au récepteur RANK des pré-ostéoclastes (Khurana, 2009). À la fin de la phase de résorption, les ostéoclastes vont subir l'apoptose et seront remplacés par des macrophages, qui préparent la lacune aux étapes de formation osseuse (Kini et Nandeesh, 2012). S'en suit l'étape d'inversion, phase pendant laquelle les précurseurs ostéoblastiques envahissent les lacunes de résorption, prolifèrent et se différencient en ostéoblastes matures. Ceux-ci vont sécréter les protéines de la matrice osseuse, comme le collagène de type I et des peptidoglycanes (Meunier et al., 2005). Cette matrice ostéoïde est alors minéralisée par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite entre les fibres collagènes. Ce processus est réalisé principalement par l'ALP, qui hydrolyse les esters phosphoriques et permet la fixation des cristaux d'hydroxyapatite sur la matrice.

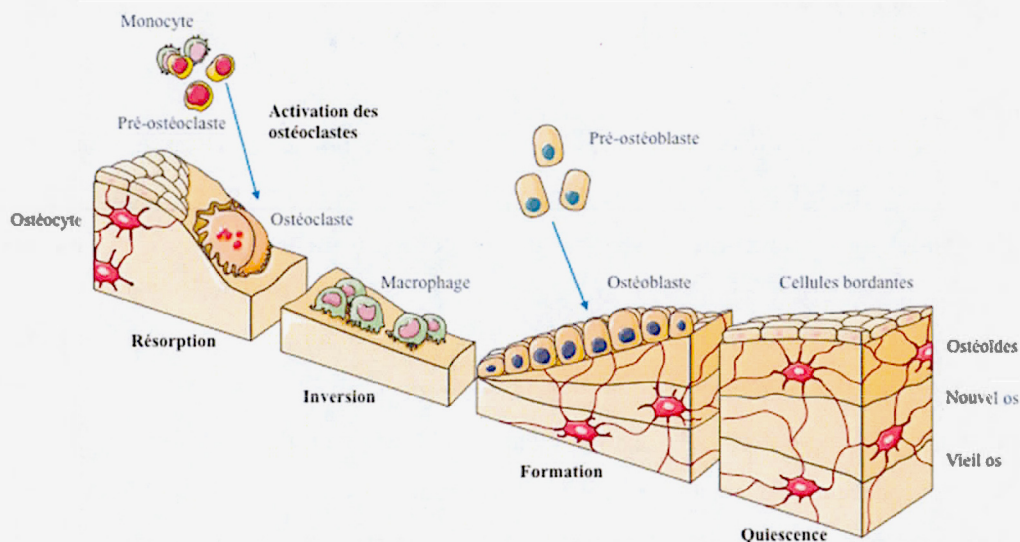


Figure 1.3 Remodelage osseux

Schéma représentant les différentes phases du remodelage osseux ainsi que les différents acteurs. Le remodelage débute par une phase de recrutement et d'activation des monocytes qui se différencient en ostéoclastes, et effectuent la résorption. À la fin de ce processus, des macrophages procèdent au nettoyage de la lacune de résorption durant la phase d'inversion, laissant place par la suite aux pré-ostéoblastes qui envahissent l'espace lacunaire, se différencient en ostéoblastes et assurent ainsi la formation d'une nouvelle matrice minéralisée. Lors de ce dernier processus, des ostéoblastes sont englobés dans la matrice et deviennent des ostéocytes. Modifié à partir de Servier Medical Art.

L'équilibre entre la résorption et la formation osseuse assure un renouvellement adéquat du tissu osseux. À cette fin, il est contrôlé par de multiples hormones et facteurs (Figure 1.4), tels la parathormone (PTH) et la calcitonine, la vitamine D, les œstrogènes et les glucocorticoïdes (Meunier et al., 2005).

La PTH, la calcitonine et la vitamine D agissent conjointement sur les ostéoblastes en régulant la différenciation ostéoblastique et la différenciation des ostéoclastes (Marieb, 2005). Lorsque la calcémie chute, la PTH est sécrétée par les glandes parathyroïdes et se fixe à son récepteur à la surface des ostéoblastes. Ceci augmente la sécrétion de M-CSF et l'expression de RANKL par les ostéoblastes, et inhibe leur synthèse d'OPG, favorisant ainsi la différenciation des ostéoclastes et la résorption osseuse. Cette augmentation de la

résorption permet de relâcher du calcium du tissu osseux vers la circulation afin de ramener la calcémie à un niveau normal. Inversement, quand celle-ci est trop élevée, l'hormone calcitonine est sécrétée par la glande thyroïde et elle se fixe à son récepteur à la surface des ostéoclastes, ce qui interrompt leur activité et entraîne une inhibition de la résorption osseuse (Marieb et al., 2005). La vitamine D favorise l'absorption intestinale des ions calciques ainsi que leur réabsorption par les reins, et ainsi contribue indirectement à la régulation du métabolisme osseux en assurant un apport en ions calcium. Aussi, elle favorise la mobilisation du calcium par une stimulation de la résorption osseuse en favorisant la différenciation des ostéoblastes, ce qui augmente la libération des facteurs favorisant la prolifération des ostéoclastes (De Luca, 2004). Par ailleurs, la PTH et la calcitonine contribuent à réguler le cycle de la vitamine D puisqu'elles agissent sur l'activité 1α -hydroxylase rénale qui permet sa transformation en une forme active. En effet, la PTH stimule cette activité enzymatique tandis que la calcitonine inhibe celle-ci (De Luca, 2004; Marieb et al., 2005).

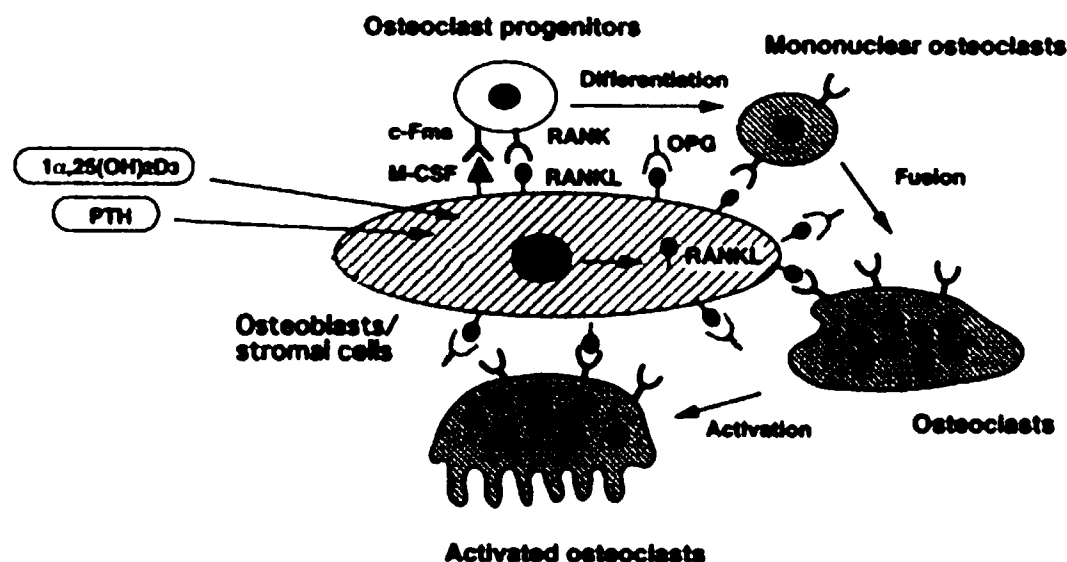


Figure 1.4 Représentation schématique de la régulation du remodelage osseux.

Les précurseurs d'ostéoclastes et les ostéoclastes matures expriment à leur surface RANK, le récepteur de RANKL. Plusieurs facteurs stimulent l'expression de RANKL dans les ostéoblastes, dont la PTH et la vitamine D. La différenciation des ostéoclastes est induite par la liaison de RANK à RANKL et de M-CSF à son récepteur c-Fms à la surface des pré-

ostéoclastes. Les ostéoblastes produisent l'OPG, un ligand soluble à RANKL, pouvant donc inhiber la différenciation, la fusion et l'activation des ostéoclastes, induits par RANKL. Tirée de Bilezikian et al. (2002)

1.3.5 L'ostéoporose

Un déséquilibre du remodelage osseux peut entraîner le développement de l'ostéoporose, un état caractérisé par une diminution de la masse osseuse associée à une augmentation de la fragilité des os et des risques de fractures. Elle touche plus de deux millions de personnes au Canada, dont un quart des femmes et un huitième des hommes au delà de la cinquantaine (Santé Canada). L'ostéoporose provient principalement d'un déséquilibre entre la résorption et la reformation osseuses et peut être due à une altération des fonctions ostéoclastiques ou ostéoblastiques.

Cette pathologie est caractérisée par une faible densité osseuse et une détérioration du tissu osseux, ce qui augmente le risque de fractures. Les fractures ostéoporotiques les plus répandues sont celles du col du fémur (connu sous le nom de fracture de la hanche), du poignet et de la colonne vertébrale (Santé Canada; Brantus et Meunier, 2005). Le pourcentage plus élevé d'ostéoporose chez les femmes de plus de 50 ans est dû à la ménopause. En effet la carence œstrogénique associée à la ménopause est responsable d'une perte de la masse osseuse de 15 à 20 % dans les 5 à 10 premières années (Brantus et Meunier, 2005). De même, le tabac, la carence en vitamine D et calcium ainsi que l'âge figurent parmi les facteurs de risque de l'ostéoporose. Toutefois, dans bien des cas un diagnostic d'ostéoporose suit une fracture et les causes sont souvent incertaines (Santé Canada).

Ainsi, certains des facteurs régulateurs de l'expression de l'*APOD/apoD*, tels les œstrogènes et les glucocorticoïdes, influencent aussi le métabolisme osseux. Les œstrogènes ont des effets anti-apoptotiques (Okazaki et al., 2002), en plus d'augmenter la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ainsi que de leurs précurseurs via la stimulation de la production de « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β) et de « Bone Morphogenetic

Proteins » (BMP). Par contre, l'effet des glucocorticoïdes sur la différenciation des ostéoblastes est complexe et dépend du stade de maturation. Ils sont connus pour induire l'ostéoporose par une inhibition de la prolifération des ostéoblastes, sans toutefois influencer leur différenciation (Walsh et al., 2001). De plus, l'œstrogène figure parmi les ligands de l'APOD/ApoD, de même que le cholestérol. Or ces derniers sont essentiels au remodelage osseux. Ceci pourrait alors attribuer un rôle à l'APOD/ApoD dans le métabolisme osseux.

1.3.6 L'apolipoprotéine D et le métabolisme osseux

Il a été démontré que l'*APOD* est exprimée dans les MSC humaines ainsi que dans les cellules de la lignée Saos-2 issues d'ostéosarcomes humains (Ishii et al., 2005; Sasaki et al., 2009), et que son expression augmente avec la différenciation ostéoblastique. En effet, en comparant l'expression des différents gènes des MSC avec ceux de fibroblastes humains, douze présentaient une différence significative dans le niveau d'ARNm, dont l'*APOD*. Le niveau d'ARNm de celle-ci était significativement plus faible dans les MSC par rapport à celui retrouvé dans les fibroblastes. Néanmoins, suite à la différenciation ostéogénique en ostéoblastes, le niveau d'expression de l'*APOD* était augmenté, ce qui en faisait un marqueur de la différenciation des MSC (Ishii et al., 2005). Parallèlement, l'analyse de l'influence de la famille des facteurs de transcription de p53 sur l'expression de l'*APOD* a démontré son expression dans des cellules d'ostéosarcomes humains Saos-2. Un de ces facteurs de transcription, TAp73, y induit la différenciation ostéoblastique via l'activation du gène *APOD*. Ceci laisse croire que l'apoD aurait un rôle dans les fonctions des ostéoblastes, notamment dans sa différenciation (Sasaki et al., 2009).

Notre laboratoire, en collaboration avec celui d'Éric Rassart, a débuté une analyse du phénotype osseux des souris KO-*apoD*. Cette étude a démontré une masse osseuse diminuée chez les femelles KO-*apoD* par rapport aux femelles WT, avec une différence significative du ratio BV/TV (volume de l'os sur le volume total). Cette masse osseuse réduite chez les femelles KO-*apoD* est accentuée avec l'âge (-18, -47, -50 and -78% pour les souris de 3, 6, 9

et 12 mois respectivement). Par contre, le ratio BV/TV ne montrait pas de différence significative entre les mâles KO-*apoD* et les mâles WT (figure 1.5, données non publiées).

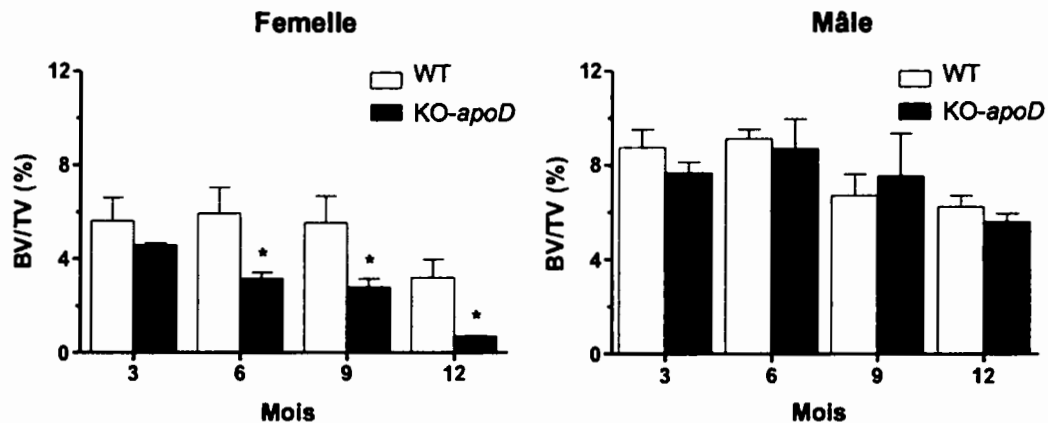


Figure 1.5 Analyse morphométrique de la portion trabéculaire de fémurs de souris femelles et mâles WT et KO-*apoD*.

L'analyse a été réalisée par microtomographie à rayon X au niveau de la portion trabéculaire des fémurs de souris C57BL/6 de 3, 6, 9 et 12 mois (3 à 7 souris par groupe d'âge pour chaque génotype) afin de déterminer le pourcentage du volume de l'os (BV) sur le volume total (TV). Un test de covariance de type ANOVA et un post-test Bonferroni ont été réalisés et montrent une différence significative (* $P < 0.05$) comparée aux souris WT du même âge.

La différence de densité osseuse mesurée entre les souris femelles KO-*apoD* et WT était corrélée morphologiquement avec une diminution du nombre de trabécules, tandis que l'épaisseur de leurs trabécules ne présentait pas de différence (Figure 1.6, données non publiées). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression de l'*apoD* contribue à la régulation du métabolisme osseux chez les souris femelles. L'analyse histologique de coupes de fémurs de souris par une coloration Von Kossa a confirmé ce phénotype, puisque les os de souris femelles KO-*apoD* présentaient une minéralisation réduite (Appendice A). De plus, une coloration TRAP des sections osseuses, analysant l'activité de la phosphatase acide tartrate-résistante, n'a pas démontré de différence entre les fémurs de souris KO-*apoD* ou WT. Ce résultat est corrélé avec un nombre semblable d'ostéoclastes. Par contre, la

coloration ALP des coupes de fémurs, analysant l'activité de la phosphatase alcaline, a démontré une différence entre les souris femelles WT et *KO-apoD*, indiquant un nombre réduit d'ostéoblastes chez les dernières, alors que cette différence n'est pas retrouvée chez les souris mâles (Appendice A). Ceci suggère que l'ApoD contribuerait aux fonctions des cellules ostéoblastiques.

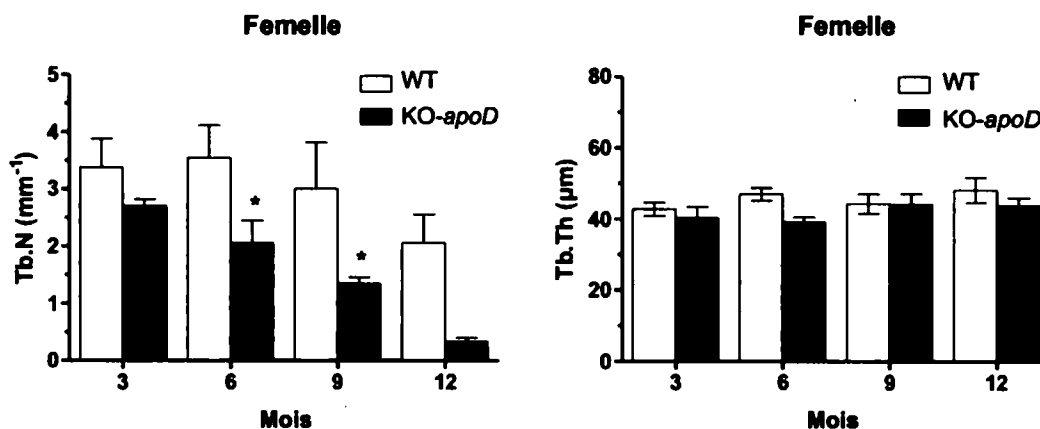


Figure 1.6 Analyse morphométrique du fémur de souris femelles WT et *KO-apoD*.

L'analyse a été réalisée par microtomographie à rayon X au niveau de la portion trabéculaire des fémurs de C57BL/6 de 3, 6, 9 et 12 mois (3 à 7 souris par groupe d'âge pour chaque génotype) afin de déterminer le nombre de trabécules (Tb.N) et l'épaisseur de ceux-ci (Tb.Th). Un test de covariance de type ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni ont été réalisés et montrent une différence significative (* $P < 0.05$) comparée aux souris WT du même âge.

CHAPITRE II : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Puisque les souris femelles KO-*apoD* présentent un phénotype osseux significativement différent de celui des souris WT, et considérant que l'expression de l'*apoD* a déjà été détectée chez des cellules ostéoblastiques, nous avons émis comme hypothèse principale que l'ApoD joue un rôle dans la régulation du métabolisme osseux.

Ainsi, notre premier objectif était de déterminer l'expression de l'*apoD* dans les cellules ostéoblastiques murines et d'étudier sa régulation. Nous avons choisi d'utiliser la lignée ostéoblastique murine MC3T3, un modèle cellulaire communément utilisé pour ses caractéristiques ostéoblastiques. Nous nous sommes basés principalement sur les résultats de Do Carmo et al. (2007), ayant travaillé avec des fibroblastes murins, et nous avons considéré la présence, dans le promoteur du gène, de différents éléments de réponse, afin de déterminer le niveau d'expression de l'*apoD* dans les cellules MC3T3 suite à des traitements induisant un stress oxydatif, en condition de privation de sérum et à des traitements aux glucocorticoïdes, tels que le dexaméthasone.

Puisqu'il était rapporté que l'expression de l'*apoD* augmente avec la différenciation des MSC en ostéoblastes (Ishii et al., 2005), notre deuxième objectif a consisté à étudier l'influence de la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3 sur l'expression de l'*apoD*.

De plus, l'ApoD étant une protéine sécrétée, nous avons étudié l'influence que pouvait avoir l'ajout d'APOD au milieu de culture de cellules MC3T3 sur les fonctions ostéoblastiques.

Finalement, puisque les souris femelles KO-*apoD* présentent un phénotype différent des souris WT, nous avons postulé que cette différence pouvait se traduire par une altération

des fonctions des ostéoblastes. Ainsi, notre dernier objectif visait à comparer les fonctions des ostéoblastes isolés de souris WT et KO-*apoD*, en culture primaire.

CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE

3.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour le présent projet sont les lignées cellulaires MC3T3, U-2 OS et MG-63 et des cultures primaires d'ostéoblastes isolés d'os de souris C57BL/6 de type sauvage (WT) ou ayant une déficience en *apoD* (KO-*apoD*).

3.1.1 Lignée cellulaire murine

La lignée cellulaire MC3T3 a été acquise de l' « American type culture collection » (ATCC). Ce sont des cellules ostéoprogénitrices provenant d'os de calvaria de souris C57BL/6. Elles ne sont pas transformées et n'ont pas été immortalisées et ainsi représentent un modèle adéquat pour les études des fonctions ostéoblastiques. Elles sont très utilisées pour étudier la différenciation cellulaire des ostéoblastes puisqu'elles expriment les principaux gènes, tels que l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse, le collagène de type I et le récepteur de PTH. Elles ont été maintenues en culture dans du milieu complet «alpha Minimum Essential Medium» (α MEM, Wisent) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS, PAA), du L-Glutamine à 2 mM (Invitrogen) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine Pen/Strep à 100 unités/mL et 100 μ g/mL respectivement, Invitrogen), à 37 °C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. Un passage des cellules a été réalisé hebdomadairement. Pour cela, les cellules adhérentes ont été détachées de la surface des pétris avec de la trypsine (Gibco, Invitrogen), comptées et remises en culture à une concentration de 4000 cellules/cm², dans le même milieu complet α MEM, avec des changements de milieu trois fois par semaine.

3.1.2 Lignées cellulaires humaines

Les lignées cellulaires U-2 OS et MG-63, provenant de l'ATCC, sont des cellules transformées provenant respectivement d'ostéosarcomes humains d'une fille de 15 ans et d'un garçon de 14 ans. Elles ont été maintenues en culture dans du milieu complet McCoy (U-2 OS) et DMEM-F12 (MG-63) supplémentés de 10% de FBS et d'antibiotiques, dans les mêmes conditions de maintien et de remise en culture que les cellules MC3T3.

3.1.3 Cultures primaires murines

Les ostéoblastes en culture primaire ont été extraits des os longs (fémurs et tibia) et calvaria (os crânien) de souris C57BL/6 WT et KO-*apoD*. Ces souris ont été euthanasiées selon les règles du Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA), et les os ont été récupérés, puis les tissus environnants ont été enlevés. Les extrémités des os longs ont été sectionnées et la moelle osseuse a été extraite par centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes. Les cellules de la moelle ont ensuite été mises en culture dans du milieu complet α -MEM supplémenté de 20% de FBS. Après 48 h, les cellules non adhérentes ont été éliminées par lavages au tampon phosphate salin stérile (PBS: 8 g/L NaCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L KCl, 0.1 g/L CaCl₂ et 0.1 g/L MgCl₂, pH 7.4), supplémenté des antibiotiques Pen/Strep 2X (200 unités/mL pénicilline et 200 µg/mL streptomycine), afin de sélectionner uniquement les cellules adhérentes mésenchymateuses. Les cellules de moelle osseuse ont alors été maintenues en culture, avec des changements de milieu hebdomadaire, jusqu'à l'atteinte de la confluence. Les os, vidés de moelle osseuse, ainsi que le calvarium, ont été coupés en petits morceaux et lavés trois fois dans du PBS supplémenté d'antibiotiques. Ils ont ensuite été digérés deux fois durant vingt minutes à 37 °C avec 1 mg/mL de collagénase (Sigma), dans du milieu α MEM sans sérum. Les fragments ont

ensuite été rincés trois fois avec du PBS supplémenté d'antibiotiques, incubés de nouveau avec la collagénase pendant quarante minutes et rincés trois fois par la suite. Les fragments ont été finalement mis en culture dans du milieu α MEM contenant 10% de FBS, dans les mêmes conditions que les cellules extraites de la moelle osseuse.

Lors de l'atteinte de la confluence, les cellules ont ensuite été dispersées à une concentration de 30 000 cellules/cm² dans différents contenants afin de réaliser les différentes expériences. Contrairement aux lignées cellulaires, les cellules en culture primaire étaient décollées à l'aide d'un grattoir à cellule sans utiliser de trypsine.

3.2 Traitements des cultures cellulaires

Afin d'étudier la régulation de l'expression de l'*apoD*, les cellules ostéoblastiques MC3T3 ont été mises en culture dans des plats Pétri de 60 mm (Sarsted) à une densité de 4000 cellules/cm² et ont été soumises à différents traitements à partir de l'atteinte de confluence.

Le traitement aux glucocorticoïdes a été réalisé par ajout de dexaméthasone (Sigma), qui est un glucocorticoïde synthétique, à une concentration de 10⁻⁷ M dans le milieu. Le traitement à l'acide ascorbique (Sigma) a été réalisé avec une concentration de 50 µg/mL d'acide ascorbique. Le stress oxydatif a été induit par un traitement de 2 h au peroxyde d'hydrogène avec une concentration finale de 300 µM, suivi d'un lavage et d'un remplacement par du milieu sans peroxyde d'hydrogène. Ces trois traitements ont été réalisés sur 24 h. Dans le cas de la privation de sérum, celle-ci a été réalisée sur 48 h, incluant un pré-traitement de 24 h avant le début des autres traitements. Ils ont tous été arrêtés au même moment par l'extraction de l'ARN. Il faut noter que ces traitements ont été réalisés dans du milieu « Minimum Essential Medium » (MEM, HyClone) supplémenté de L-glutamine (2mM) et de Pen/Strep (à 100 unités/mL et 100 µg/mL) et contenant 10% de FBS. Il remplace le milieu α MEM dans lequel les cellules étaient mises en culture car il ne contient

pas du rouge de phénol ni d'acide ascorbique, qui favorisent respectivement la prolifération et la différenciation cellulaire des ostéoblastes et interfèrent donc avec les traitements.

La différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3 a été induite par l'ajout de 10 mM de β -glycérophosphate (Sigma) et de 50 μ g/mL d'acide ascorbique au milieu de culture α MEM lorsque les cellules ont atteint la confluence, avec des changements de milieu 3 fois par semaine comme pour le maintien en culture, sur une période allant de 0 à 32 jours. L'arrêt du traitement (aux jours 0, 7, 14, 21, 28 et 32) a été induit par l'initiation de l'extraction d'ARN au RiboZol (Amresco), l'extraction étant complétée pour tous les échantillons en même temps.

Finalement, le traitement à l'APOD pour les tests des fonctions ostéoblastiques a été réalisé par l'ajout au milieu de culture de 200 ng/mL d'APOD humaine, extraite et purifiée à partir de kystes mammaires dans le laboratoire d'Éric Rassart, avec des changements de milieu 2 à 3 fois par semaine comme pour le maintien en culture. Les fonctions ostéoblastiques de cellules non traitées à l'APOD ont été analysées en parallèle.

3.3 Analyse de l'expression génique par RT-PCR

Afin de déterminer l'influence des traitements sur l'expression génique de l'*apoD*, l'ARN total a été extrait des ostéoblastes avec du RiboZol (Amresco) selon les indications de la compagnie. Une transcription inverse (RT) a ensuite été réalisée avec 2 μ g de cet ARN, grâce à une trousse de la compagnie Qiagen, en utilisant des hexamères, afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Les ADN de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*) et de l'*apoD* ont ensuite été amplifiés par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à une trousse de PCR impliquant la Taq polymérase de la compagnie Feldan. L'amplification a été réalisée avec des amorces spécifiques (Tableau 3.1), par une PCR de 40 cycles selon les étapes suivantes : dénaturation à 94 °C pendant 60 secondes, hybridation à 58 °C pendant 30 secondes et élongation à 72 °C pendant 60 secondes.

Tableau 3.1 Séquences des amorces utilisées (de la compagnie Operon et Invitrogen)

	Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
Souris	<i>gapdh</i>	5' AGAACATCATCCCTGCATCC 3'	5' AGTTGCTGTTGACGTCGC 3'
	<i>apoD</i>	5' CCACCGGCACCCTACTGGATC 3'	5' CGGGCAGTTCGCTTGATCTGT 3'
Humain	<i>GADPH</i>	5' TACGGCAACAGATACAAGAACG 3'	5' TCGGCTGCCATAAATATAGG 3'
	<i>APOD</i>	5' TTAACCTCACAGAGCCTGCC 3'	5' GAGTCCACTGTTTCTGGAGGG 3'

Suite aux réactions PCR, les produits obtenus ont été migrés par électrophorèse (PowerPack Basic, BIO-RAD) sur gel d'agarose (2%) et révélés à l'aide du RedSafe (iNtRON Biotechnology). Les photos de gel étaient prises avec l'appareil AlphaImager (Alpha Innotech Corporation). Finalement, l'expression des gènes étudiés a été comparée à celle d'un gène de référence, le *GAPDH* ou *gapdh*, par densitométrie avec les logiciels AlphaImager et ImageJ.

3.4 Essais de viabilité et de prolifération

L'impact de l'ajout d'APOD dans le milieu de culture sur la prolifération cellulaire des ostéoblastes a été évalué par analyse du cycle cellulaire grâce à un marquage à l'iodure de propidium (IP) ainsi que par analyse de la synthèse d'ADN par l'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU). Dans le premier cas, l'intercalation de l'IP dans l'ADN permet de différencier les cellules en fonction de leur phase dans le cycle cellulaire, les cellules en phase G2 ayant le double de la quantité d'ADN des cellules en phase G1. Dans le deuxième cas, le BrdU est incorporé par les cellules synthétisant de l'ADN, permettant de comparer la quantité relative d'ADN nouvellement synthétisé selon les conditions de traitements. Ces deux tests sont réalisés sur des cellules ayant été sevrées (sans FBS) pendant 24 h dans du

milieu α MEM, puis traitées pendant 24 h avec 200 nM d'APOD purifiée. Les résultats ont été comparés à un témoin négatif maintenu en sevrage pendant ces 24 h et, dans le cas du cycle cellulaire, aussi à un témoin positif dont le milieu a été remplacé par du α MEM supplémenté de 10% de FBS, les deux témoins n'impliquant pas l'ajout d'APOD. Pour les analyses du cycle cellulaire, les cellules ont alors été décollées avec de la trypsine, centrifugées à 1500 g pendant 10 minutes puis fixées à l'éthanol 70% froid pendant au moins 1h. Elles ont ensuite été centrifugées de nouveau et rincées 2 fois au PBS (avec centrifugations) puis resuspendues dans du PBS contenant 0.2 mM de RNase (Roche), afin d'éliminer les ARN présents dans l'échantillon, pouvant aussi être marqués à l'IP et ainsi biaiser les résultats. Les cellules ont donc été incubées pendant 1h à 37 °C avec la RNase, puis l'IP (Roche) a été ajouté à une concentration finale de 50 μ g/mL et les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson). Les résultats ont été analysés grâce au logiciel FlowJo (version 8.7.3). Les analyses par incorporation du BrdU ont été réalisées avec la trousse « Cell Proliferation ELISA BrdU » (Roche) en suivant les indications de la compagnie. Il est à noter que l'incubation optimale avec le BrdU était de 2 h dans les milieux de culture respectifs, tandis que l'anticorps anti-BrdU a été ajouté pendant 30 minutes et la réaction avec le substrat a été analysée dès les premières 15 minutes.

La viabilité des ostéoblastes en culture primaire a été étudiée par des essais colorimétriques MTT (« microtiter tetrazolium »). Ceci permet de comparer la viabilité des cellules provenant de souris KO-*apoD* à celle des cellules provenant de souris WT. En effet, la réduction du MTT en formazan par les mitochondries des cellules vivantes produit des cristaux de couleur violet lorsque solubilisés. L'absorbance du milieu contenant les cristaux est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et peut donc être un bon indicateur de la prolifération cellulaire. Le test a été réalisé avec des cellules en culture dans des plaques de 96 puits (Sarstedt), sur une période de 21 jours, à intervalles de 3 à 7 jours. À la fin de la période de culture, du bromure de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma) à concentration finale de 0,5 mg/mL a été ajouté au milieu de culture pour une période d'incubation de quatre heures. Les milieux de culture ont été retirés et les cristaux de formazan produits ont été solubilisés avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant une heure. L'absorbance de la solution a alors été mesurée par spectrophotométrie à

une longueur d'onde de 575 nm (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek), et normalisée par rapport aux valeurs obtenues 24 h après l'ensemencement.

3.5 Analyse de la différenciation ostéoblastique

Afin d'étudier l'impact de l'APOD sur les fonctions des ostéoblastes, une comparaison entre la différenciation des ostéoblastes de cellules MC3T3 avec ou sans ajout d'APOD exogène au milieu de culture a été réalisée. Cette analyse a été effectuée par dosage de l'ALP, enzyme dont l'expression augmente en fonction de la différenciation ostéoblastique.

Les cellules, mises en culture dans des plaques de 24 puits (Sarstedt), ont subi deux lavages au PBS puis ont été solubilisées dans du tampon de lyse ALPase (100 mM glycine, 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 1% Triton X-100) pendant une heure à 4 °C avec agitation. Les lysats ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. Le dosage de l'ALP a été réalisé par ajout du substrat p-nitrophénylphosphate (PNPP, Sigma) aux lysats, disposés dans une plaque de 96 puits, de façon à atteindre une concentration finale de 6.25mM. Le tout a été incubé jusqu'à une heure à 37 °C en fonction du développement de la coloration jaune et la réaction a été arrêtée, par ajout de NaOH 1M. L'absorbance a ensuite été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek). L'hydrolyse du substrat PNPP ajouté dans le milieu par une enzyme phosphatase comme l'ALP donne en effet un produit de couleur jaune : le p-nitrophényl (PNP). Ainsi, la concentration enzymatique a été calculée grâce à une courbe standard établie avec différentes concentrations de PNP dans les mêmes conditions que le dosage enzymatique. La quantité de protéines totales a été mesurée par microBCA (ThermoScientific) en utilisant l'albumine sérique de bovin (BSA) comme standard. L'activité enzymatique a été calculée en mol de PNP par mg de protéines totales.

Le dosage ALPase a été réalisé sur des cellules maintenues en culture de 0 à 21 jours après atteinte de confluence (aux jours 0, 7, 14 et 21), ayant subi 2 traitements différents :

témoin non traité (milieu α MEM supplémenté de 10% FBS) et cellules traitées à l'APOD (milieu du témoin contenant 200 ng/mL d'APOD purifiée).

3.6 Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées pour certains résultats ayant été reproduits au moins trois fois afin d'assurer leur validité. Ainsi, des tests de variance de type ANOVA ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPrism 5.0 pour les analyses de l'expression génique, comprenant plus de trois groupes à étudier, tandis que des tests t de Student ont été effectués pour les comparaisons entre cellules WT et KO-*apoD*. Une valeur de P inférieure à 0,05 a été considérée comme étant une différence significative entre les valeurs et est indiquée par une astérisque dans les figures. De plus, les écarts-type présentés dans les figures correspondent aux écarts à la moyenne (SEM) sauf si indiqué différemment.

CHAPITRE IV : RÉSULTATS

Le rôle de l'ApoD a été principalement étudié dans le système nerveux, où son expression augmente dans plusieurs maladies neurodégénératives (Rassart et al., 2000). L'étude de l'implication de l'ApoD dans le métabolisme osseux en est encore à ses prémises. Nous avons initié le présent projet en étudiant la modulation de son expression génique dans le modèle d'ostéoblastes murins, les cellules MC3T3 en nous inspirant des travaux publiés par Do Carmo et al, 2007 portant sur des fibroblastes murins. L'expression de l'*apoD* a d'abord été confirmée dans cette lignée par RT-PCR (donnée non présentée) en obtenant une bande correspondant à une amplification d'ADN possédant une taille de 219 pb, en accord avec celle attendue pour le transcrit de l'*apoD*. Ensuite, nous avons traité durant 24h les ostéoblastes murins de la lignée MC3T3 au peroxyde d'hydrogène, à un glucocorticoïde synthétique (dexaméthasone) ainsi qu'à l'acide ascorbique, un agent utilisé lors de la différenciation des ostéoblastes (Park, 2012). La viabilité des cellules face aux traitements a été vérifiée par observation microscopique, les cellules ne présentant pas de mortalité anormale ou accrue. Par la suite, l'ARN total des cellules a été utilisé pour des analyses semi-quantitatives par RT-PCR. Les résultats présentés à la figure 4.1 montrent que le traitement au dexaméthasone ne semble pas affecter l'expression génique de l'*apoD*, tandis que le traitement au peroxyde d'hydrogène tend à diminuer le niveau de transcrits de l'*apoD* (environ 35%) et le traitement à l'acide ascorbique fait chuter significativement l'expression de l'*apoD* d'environ 50%.

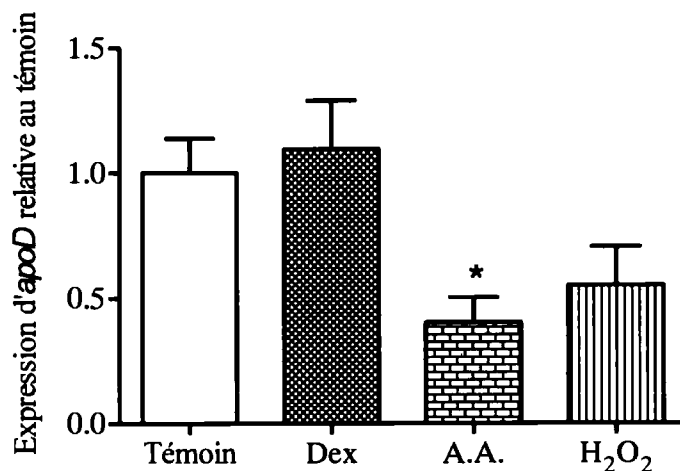


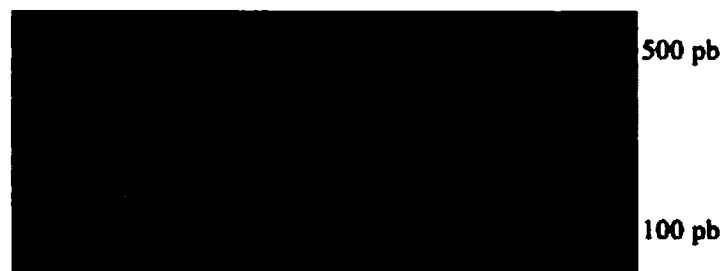
Figure 4.1 Expression génique de l'apoD selon différents traitements réalisés sur des cultures d'ostéoblastes MC3T3.

Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec 10^{-7} M de dexaméthasone (Dex, N=5) ou avec 25 µg/mL d'acide ascorbique (A.A., N=4). Le traitement au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisé pendant 2h à 300 nM, le milieu étant ensuite remplacé par du milieu α MEM supplémenté de 10% FBS pour le reste des 24 h (N=3). Un échantillon témoin a été maintenu dans du milieu α MEM supplémenté de 10% FBS (N=6). À la fin des traitements, l'ARN total des cellules ostéoblastiques a été isolé. Suite à la synthèse de l'ADNc, des amplifications de type PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques pour l'apoD de souris. Une analyse semi-quantitative a été réalisée en comparant l'intensité des bandes par rapport à l'expression du gène de référence *gapdh*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM et les données ont été analysées par un test de variance ANOVA en fonction du témoin ($p^* < 0.05$).

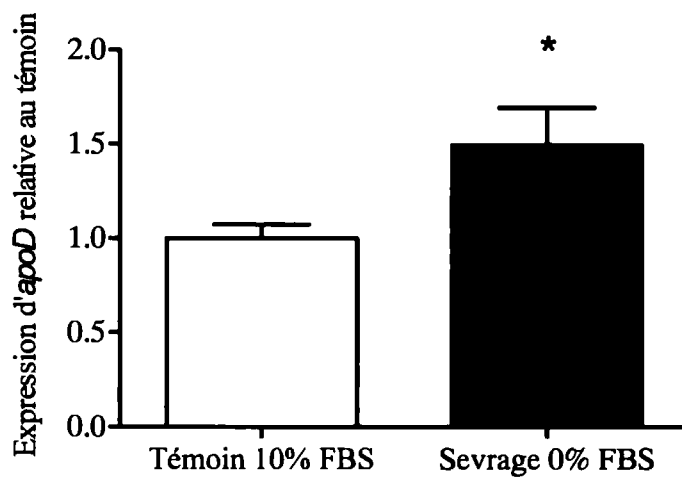
Outre ces traitements, l'expression de l'apoD a été inversement reliée à la prolifération cellulaire des fibroblastes (Provost et al., 1991; Do Carmo et al. 2007). Nous avons alors étudié l'effet du sevrage des cellules MC3T3 sur l'expression de l'apoD. Un sevrage de 48 h amène une augmentation significative de 50% de l'expression de l'apoD (figure 4.2A et B). Afin de confirmer l'effet du sevrage sur la prolifération, des analyses de cycle cellulaire par marquage à l'IP et de synthèse d'ADN par incorporation de BrdU ont été réalisées. La figure 4.2C montre que l'absence de sérum dans le milieu de culture amène une augmentation significative du pourcentage de cellules en phase G1 (de 60 à 80%), reliée à une diminution significative (de 30 à 20%) du pourcentage de cellules en phase G2/M. Dans

les mêmes conditions de culture, les essais d'incorporation de BrdU ont indiqué que la synthèse d'ADN tend à diminuer pour les cellules en sevrage, comparées aux cellules maintenues dans des conditions témoin avec 10% FBS (figure 4.2D).

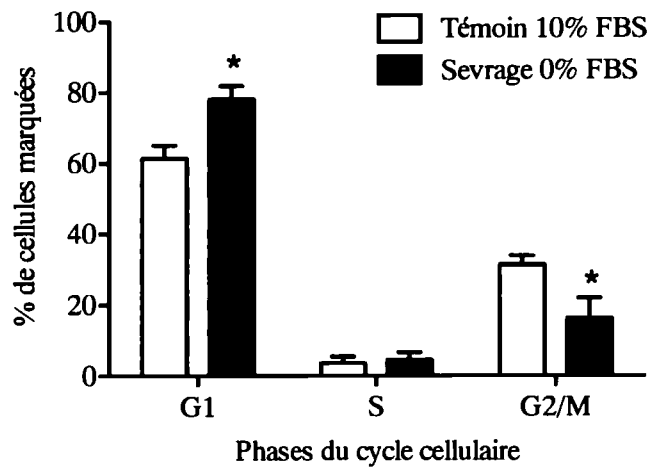
A)



B)



C)



D)

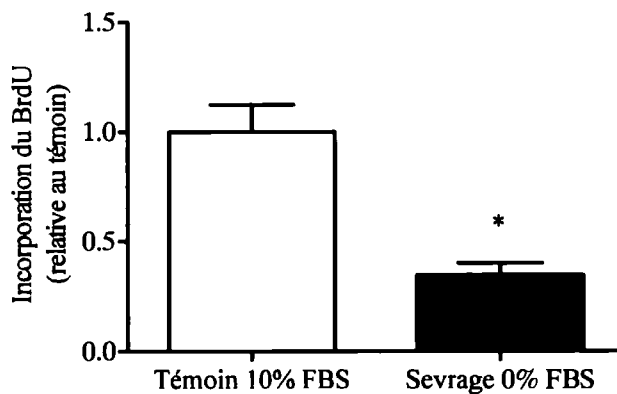


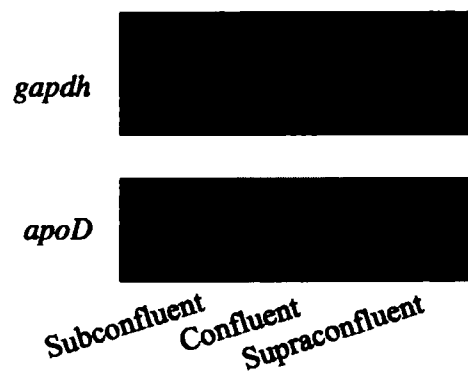
Figure 4.2 Expression génique de l'apoD par des cultures d'ostéoblastes MC3T3 en condition de sevrage.

A et B) L'ARN total a été isolé de cellules ostéoblastiques après un sevrage de 48 h dans un milieu α MEM sans FBS et de cellules « témoin » maintenues dans un milieu α MEM supplémenté de 10% FBS. Des amplifications de type PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces pour l'apoD de souris. A) Une photo représentative de la migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 2%. La piste de gauche pour les deux différents gènes représente la

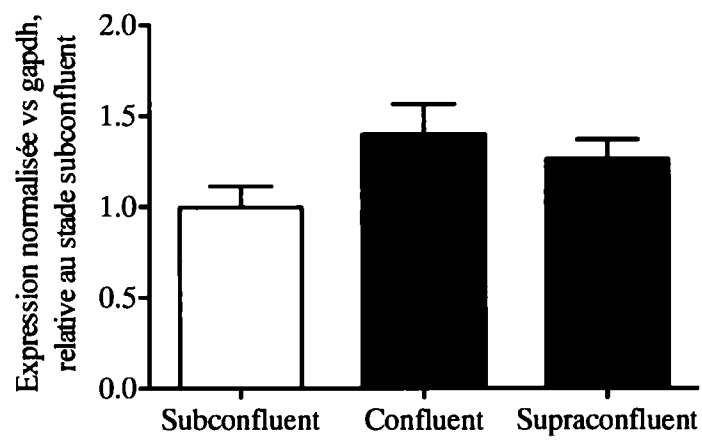
condition témoin et la piste de droite, la condition sevrée. Un standard de poids moléculaire à intervalles de 100 pb réalisé à partir de plasmides digérés (BioLabs) a été migré à titre de référence. B) Une analyse semi-quantitative a été réalisée en comparant l'intensité des bandes par rapport à l'expression du gène de référence *gapdh*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 8 expériences indépendantes. Un test t de Student démontre une différence significative entre les conditions sevrage et témoin ($p^* < 0.05$). C) Analyse de la prolifération des ostéoblastes sevrés ou en condition témoin par l'étude du cycle cellulaire par marquage à l'IP et cytométrie en flux. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Un test t de Student démontre une différence significative entre les conditions sevrage et témoin ($p^* < 0.05$). D) Analyse de la synthèse d'ADN par un test d'incorporation de BrdU. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en 8 réplicats. Un test t de Student démontre une différence significative entre les conditions sevrage et témoin ($p^* < 0.05$).

Dans le but de confirmer cette tendance à la hausse de l'expression génique de l'apoD lors d'une réduction de la prolifération, une autre approche expérimentale a été testée. Le niveau d'expression de l'apoD a été étudié pour des cellules MC3T3 à différents stades de confluence, à savoir, lorsqu'elles recouvraient 70% de la surface du pétri (nommé stade subconfluent), lorsqu'elles atteignaient la confluence (100% de la surface) et 4 jours après l'atteinte de la confluence (nommé stade supraconfluent). Les figures 4.3A et B montrent que l'expression génique de l'apoD chez les cellules MC3T3 augmente (40%) avec l'atteinte de la confluence. Dans les mêmes conditions de culture, l'analyse du cycle cellulaire et de l'incorporation de BrdU indique que l'atteinte de la confluence est associée à une réduction de la prolifération cellulaire (Figure 4.3C et D). En effet, le nombre de cellules en phase G2/M diminue significativement entre 70% de confluence et suite à son atteinte, passant de 30% des cellules vivantes à moins de 5%. De même, la proportion de cellules en phase G1 augmente, passant de 60 à plus de 80% des cellules vivantes. De même, la synthèse d'ADN tend à diminuer suite à l'atteinte de confluence.

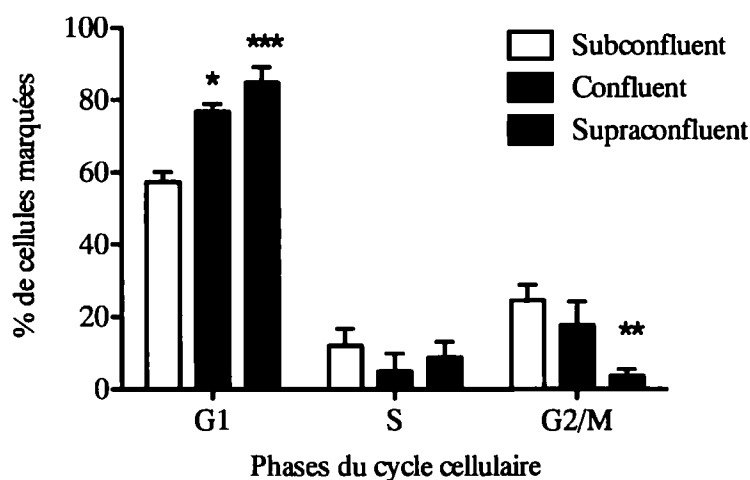
A)



B)



C)



D)

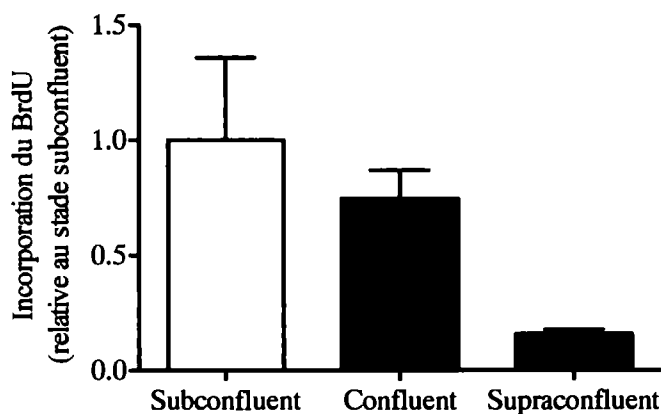


Figure 4.3 Expression génique de l'apoD selon la confluence des cultures d'ostéoblastes MC3T3.

L'ARN total des cellules ostéoblastiques a été isolé avant l'atteinte de confluence (stade subconfluent), à l'atteinte de la confluence (stade confluent) et 4 jours après (stade supraconfluent). A) Photo représentative des amplifications de type PCR réalisées à l'aide d'amorces pour l'apoD de souris. B) Quantification du niveau d'expression de l'apoD selon les différentes conditions de culture. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 4 expériences indépendantes. L'analyse de variance ANOVA montre une différence significative ($p^* < 0.05$)

entre les moyennes pour $N = 4$. C) Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium et cytométrie en flux. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. L'analyse de variance ANOVA démontre des différences significatives entre les différents états de confluence (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$) comparé au stade subconfluent. D) Analyse de la synthèse d'ADN par incorporation de BrdU pour les différentes conditions de culture. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD d'une expérience réalisée en 8 réplicats.

Finalement, il était intéressant d'étudier l'importance qu'aurait l'apoD dans les fonctions spécifiques aux ostéoblastes. Ces cellules responsables de la formation de la matrice osseuse prennent leurs fonctions lorsqu'elles sont matures et différenciées. L'expression génique de l'apoD a alors été analysée en fonction de la différenciation ostéoblastique. La figure 4.4 montre que l'expression génique de l'apoD augmente en condition de différenciation. En effet, une analyse par RT-PCR de l'ARN extrait d'ostéoblastes ayant été traités pendant 14 et 21 jours avec un milieu de différenciation contenant du β -glycérophosphate (5 mM) et de l'acide ascorbique (50 $\mu\text{g/mL}$) a indiqué la présence de plus de transcrits (environ 50%) pour l'apoD que l'ARN prélevé d'ostéoblastes n'ayant pas subi de traitement de différenciation ou pour ceux ayant subi 7 jours de traitement.

A)



B)

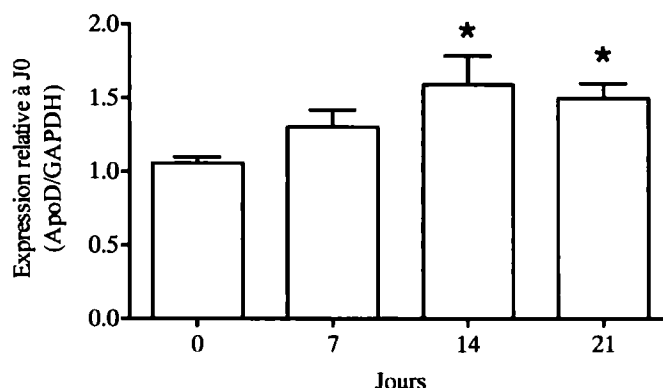


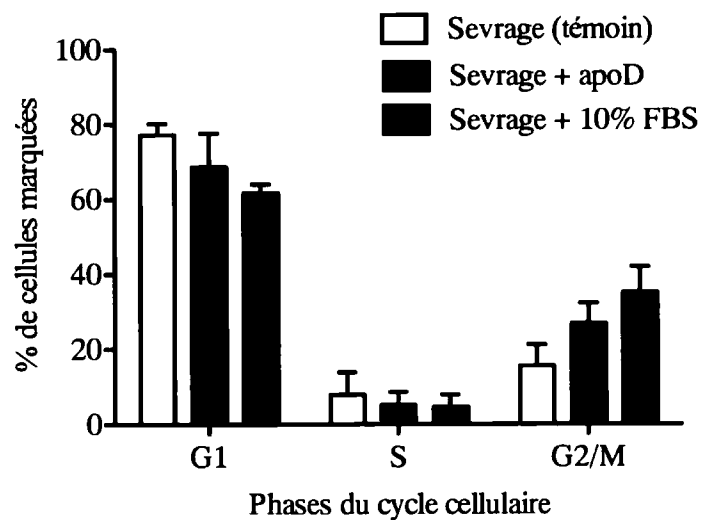
Figure 4.4 Expression de l'apoD à différents stades de différenciation des ostéoblastes MC3T3.

L'ARN total a été isolé de cellules au jour 0 maintenues dans un milieu de culture de base ou de cellules maintenues dans un milieu de différenciation additionné de β -glycérophosphate (5 mM) et d'acide ascorbique (50 μ g/mL) durant une période de 7 à 21 jours. Photo représentative de la migration des produits de PCR (A) et analyses semi-quantitatives par densitométrie selon le gène référence GAPDH (B) de l'expression génique de l'apoD des cellules en différenciation au début du traitement (jour 0) et après 7, 14 et 21 jours de culture. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les données ont été analysées par un test de variance ANOVA, suivi d'un post-test Dunnett (* $p < 0.05$), différence significative vs le début du traitement (jour 0).

Puisque l'apoD est une protéine sécrétée et considérant que l'apoD circulante peut agir sur les ostéoblastes, nous avons étudié l'influence de l'ajout d'apoD au milieu de culture sur les fonctions des cellules MC3T3. Une analyse du cycle cellulaire par marquage à l'IP ainsi qu'un test d'incorporation du BrdU ont été réalisées sur des cellules ayant été sevrées 24 h puis auxquelles l'apoD a été ajoutée pour une nouvelle période de 24 h. La figure 4.5A indique que le pourcentage des ostéoblastes traités à l'apoD tend à augmenter en phase G2/M comparativement aux cellules témoins (passant de 20 à 30%). Néanmoins cette augmentation est plus faible que celle des témoins positifs (avec 10% FBS) dont le pourcentage dépasse les 35%. La proportion de cellules en phase G1 tend à diminuer avec l'ajout d'apoD au milieu de culture, en lien avec l'augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M.

Cependant, les résultats préliminaires d'analyse de la synthèse d'ADN montrent une tendance inverse, avec une tendance à une diminution d'environ 20% de la synthèse d'ADN suite à l'ajout d'apoD dans le milieu de culture (figure 4.5B).

A)



B)

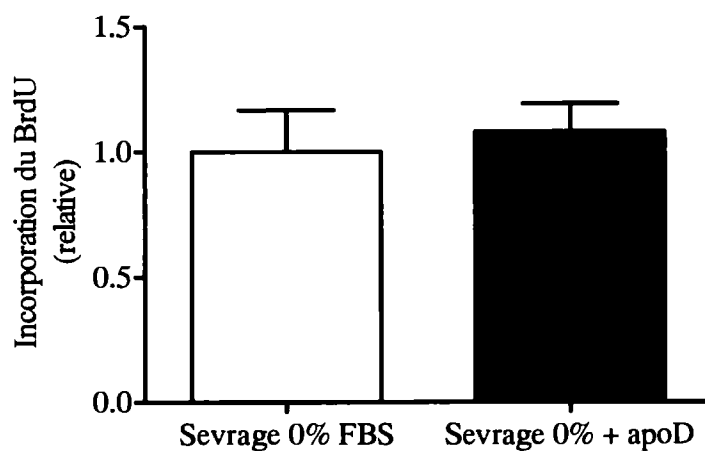


Figure 4.5 Prolifération des ostéoblastes MC3T3 suite à l'ajout d'apoD dans le milieu de culture.

A) Une analyse du cycle cellulaire par marquage à l'IP analysé par cytofluométrie en flux (N=2), ainsi qu'un B) test d'incorporation du BrdU (N=4) ont été réalisées sur des cellules ayant été sevrées 24h puis auxquelles l'apoD (200 ng/mL) a été ajoutée pour un autre 24 h, comparées à des cellules « témoin » toujours sevrées (48 h totale) ainsi qu'à des cellules « témoin positif » auxquelles un milieu supplémenté de 10% FBS a été ajouté. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

Également, il était important d'étudier l'impact de l'ajout de l'apoD sur une fonction importante des ostéoblastes, à savoir la formation osseuse. Pour ce faire, nous avons analysé la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3 en présence d'apoD, par dosage de l'ALP, une enzyme clef dans la formation osseuse qui est souvent utilisée comme marqueur de différenciation des ostéoblastes. L'ajout d'APOD au milieu de culture tend à augmenter l'activité enzymatique à partir de 7 jours de culture (Figure 4.6).

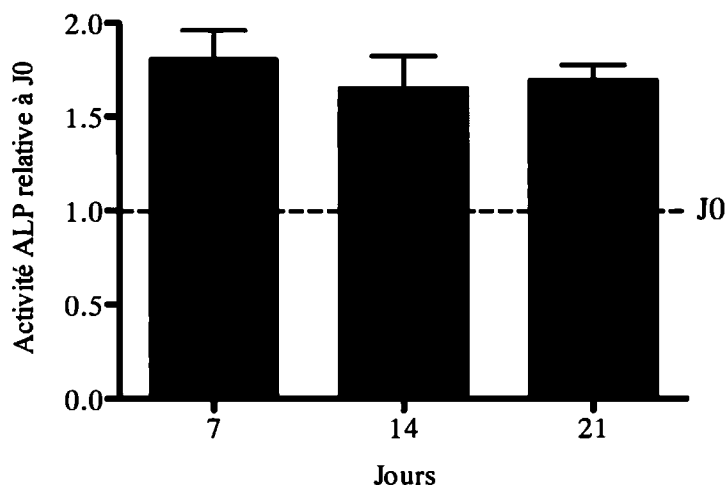


Figure 4.6 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline suite à l'ajout d'APOD.

De l'APOD humaine purifiée a été ajoutée au milieu de culture (200 ng/mL) des cellules MC3T3 pour une période de 21 jours. L'activité de l'ALP a ensuite été quantifiée à partir de lysats cellulaires en présence du substrat PNPP et normalisée par rapport au niveau mesuré au jour 0, représenté par une ligne pointillée sur la figure. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

Afin de confirmer le rôle et l'importance de l'ApoD dans les fonctions cellulaires des ostéoblastes, nous avons utilisé des cellules en cultures primaires issues d'os de souris déficientes en *apoD* (KO-*apoD*). Ainsi, la première étape était de comparer la viabilité des ostéoblastes issus de celles-ci par rapport à ceux issus de souris de type sauvage (WT). Pour ce faire, un dosage de l'activité mitochondriale par MTT a été réalisé à plusieurs intervalles sur une période de 14 jours suivant la mise en culture des cellules, en comparant avec le niveau mesuré le jour suivant l'ensemencement (J1). La figure 4.7 montre que l'activité MTT relative est plus faible à partir de 7 jours de culture chez les cellules provenant de souris KO-*apoD* par rapport à celles issues de souris WT, la différence devenant significative au jour 14.

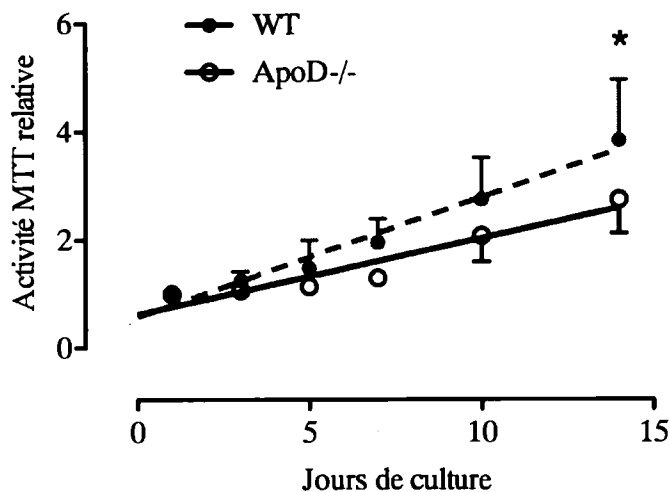


Figure 4.7 Activité mitochondriale des cellules de la moelle osseuse des souris WT et KO-*apoD*.

Les cellules de la moelle osseuse des tibias et fémurs et de la digestion des calvaria de souris femelles de 5 mois WT et KO-*apoD* ont été extraites puis mises en culture dans du milieu α MEM supplémenté de 20% FBS. La viabilité cellulaire a été mesurée par des essais MTT à différents jours de culture et normalisée par rapport à l'activité obtenue au jour suivant l'ensemencement, nommé J1. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes (2 moelles osseuses et 1 calvaria). Les données ont été analysées par un test de covariance ANOVA, suivi d'un post-test Bonferroni (* $p < 0.05$), différence significative au jour 14 entre les cellules provenant de souris WT par rapport à celles provenant de souris KO-*apoD*.

Pour finir, il était intéressant de vérifier si l'expression de l'*APOD* était spécifique aux souris ou si on la retrouvait dans les ostéoblastes humains aussi. Ainsi celle-ci a été analysée dans les lignées humaines MG-63 et U-2 OS par RT-PCR. La figure 4.8 montre des bandes correspondant à une amplification d'ADN possédant une taille d'environ 195 pb, en accord avec celle attendue pour le transcrit de l'*APOD*. L'amplification a aussi été réalisée avec un témoin positif et un témoin négatif afin de valider le résultat. De l'ADN génomique de souris *Thy1* surexprimant l'*APOD* humaine a été utilisé pour le premier témoin. Ces souris transgéniques sont transfectées du gène de l'*APOD* humaine couplé au promoteur *Thy1* et expriment donc le gène *APOD* humain. L'ADN génomique de souris WT a été utilisé comme témoin négatif, celles-ci n'expriment pas le gène humain étudié.



Figure 4.8 Expression génique de l'*apoD* par des cultures de lignées d'ostéoblastes MG-63 et U2OS.

L'ARN total des cellules ostéoblastiques a été isolé. Suite à la synthèse de l'ADNc, des amplifications de type PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques pour l'*APOD* humaine. Une photo représentative de la migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 2%. Contrôle positif (C+) réalisé avec l'ADN génomique de souris *Thy1* surexprimant l'*APOD* humaine et contrôle négatif (C-) avec l'ADN génomique de souris WT. Un standard de poids moléculaire à intervalles de 100 pb réalisé à partir de plasmides digérés (BioLabs) a été migré à titre de référence.

CHAPITRE V : DISCUSSION

Jusqu'à maintenant, l'ApoD a été principalement étudiée pour ses rôles dans le système nerveux, notamment dans les maladies neurodégénératives, dans lesquelles on lui attribue un rôle de protection. Un projet visant à étudier le rôle de l'ApoD dans le métabolisme osseux nous a été inspiré par les articles de Ishii et al., (2005) et Sasaki et al. (2009), démontrant l'expression de l'*APOD* dans des MSC humaines ainsi que dans une lignée issue d'ostéosarcomes humains. Des études préliminaires dans notre laboratoire, en collaboration avec Eric Rassart, ont alors permis d'établir que les souris femelles *KO-apoD* présentent une masse osseuse plus faible que les souris femelles WT, associée à une réduction de la formation osseuse. À la lumière de ces résultats préliminaires, le présent projet de recherche a été entrepris et visait à documenter les rôles de l'ApoD dans les ostéoblastes.

5.1 Modulation de l'expression de l'*apoD*

Nous avons d'abord confirmé l'expression génique de l'*apoD* dans la lignée ostéoblastique murine MC3T3. L'expression de l'*apoD* par les ostéoblastes murins s'ajoute à celle rapportée pour le cerveau, les glandes surrénales, les reins, le pancréas, le placenta, la rate, pour n'en citer que quelques-uns (Drayna et al., 1986; Rassart et al., 2000). Tel que mentionné plus tôt, l'étude de l'expression de l'*APOD* dans les ostéoblastes se limite aux résultats d'Ishii et al., (2005) et Sasaki et al. (2009), démontrant l'expression de ce gène dans des MSC humaines ainsi que dans la lignée issue d'ostéosarcomes humains Saos-2. Le

présent projet a donc permis de démontrer que l'*apoD* est aussi exprimé dans les ostéoblastes d'origine murine. Afin d'évaluer le rôle de l'ApoD dans les ostéoblastes, nous avons étudié la régulation de son expression génique. Nous avons déterminé l'influence de traitements aux glucocorticoïdes, à l'acide ascorbique, une vitamine qui contribue aux fonctions ostéoblastiques, et au peroxyde d'hydrogène afin de provoquer un stress oxydatif. Nos résultats indiquent que le glucocorticoïde synthétique dexaméthasone n'affecte pas l'expression de l'*apoD* tandis que l'acide ascorbique et le peroxyde d'hydrogène amènent une diminution de celle-ci. Ainsi, plusieurs différences sont retrouvées au niveau de la régulation de l'expression de l'*apoD* dans les ostéoblastes lorsque comparé à la littérature. En effet, bien que les glucocorticoïdes aient été documentés comme stimulant l'expression et la sécrétion de l'APOD, notamment dans les cellules humaines de cancer du sein (Simard et al., 1992), le traitement avec un glucocorticoïde de synthèse, le dexaméthasone, n'a pas eu d'influence significative sur l'expression génique de l'*apoD* dans les cellules MC3T3. Dans le cadre du métabolisme osseux, les glucocorticoïdes sont généralement associés avec une diminution de la formation osseuse par inhibition de la différenciation ostéoblastique et/ou par induction de l'apoptose selon les conditions de culture et le niveau de différenciation des ostéoblastes (Li et al., 2012; O'Brien et al., 2004; Rauch et al., 2010). L'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire sont reliés à la présence d'un récepteur aux glucocorticoïdes dans les ostéoblastes, notamment dans le modèle cellulaire MC3T3 (Li et al., 2012). Or il est à noter que les observations des cultures cellulaires au microscope lors du traitement n'ont pas permis de déceler un effet apoptotique. Il serait alors nécessaire de confirmer l'efficacité du traitement au dexaméthasone, par analyse des facteurs affectés par le dexaméthasone, tels que la prolifération cellulaire, par BrdU, ou l'activité transcriptionnelle de Smad3, qui sont inhibées par le glucocorticoïde. Smad3 est un facteur impliqué dans la voie de signalisation de TGF- β , (Iu et al., 2005; Li et al., 2012). De plus, l'emploi d'un antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes permettrait de confirmer que les résultats obtenus sont reliés à l'effet du dexaméthasone. Une analyse de l'apoptose par marquage à l'Annexin V et PI ou par analyse des facteurs Bax et Bcl-2 pourrait aussi être réalisée. Une absence de modulation de ces facteurs par le traitement pourrait expliquer l'absence d'effet sur l'expression de l'*apoD*. Par ailleurs, l'induction d'un stress oxydatif par un traitement au peroxyde d'hydrogène tend à diminuer l'expression de l'*apoD* par les cellules MC3T3 comparativement à la condition

témoin (figure 4.1B). Ce résultat est différent de ceux rapportés avec les fibroblastes où le peroxyde d'hydrogène augmente l'expression de l'*apoD* (Do Carmo et al., 2007). Une augmentation de l'expression de l'*apoD* suite à un stress oxydatif est en accord avec le rôle protecteur contre le stress oxydatif attribué à l'ApoD, principalement dans le système nerveux central (Ganfornina et al., 2008; Martinez et al., 2013). Cette augmentation d'expression serait régie par la voie « c-Jun N-terminal kinase » (JNK), tel que démontré pour l'homologue de l'ApoD chez la drosophile (Hull-Thompson et al., 2009) et dans les astrocytes (Bajo-Ganeras et al., 2011). Bien que le temps d'incubation lors de nos expériences ait été court (2 h), il faut noter que la concentration de peroxyde d'hydrogène utilisée lors de nos traitements (300 nM) a pu favoriser l'entrée en apoptose des cellules puisque les concentrations recommandées sont plutôt de l'ordre de 100 à 200 nM (Li et al., 2009). Ainsi l'ARN isolé pourrait ne pas être représentatif de l'effet du stress oxydatif. De plus, l'efficacité du traitement au peroxyde d'hydrogène devrait être confirmée par une mesure des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) ou par analyse de l'expression de RANKL, qui est stimulée par les ROS (Bai et al., 2005). De plus, les protéines FoxO jouent un rôle important dans la protection face au stress oxydatif, principalement FoxO1 dans les ostéoblastes (Ambrogini et al., 2010, Rached et al., 2010). Celle-ci est, entre autres, impliquée dans la prolifération ostéoblastique, notamment en régulant le cycle cellulaire via les cyclines ainsi qu'en modulant et réduisant les facteurs de transcription p53 et p66 lors d'un stress oxydatif (Rached et al., 2010). L'expression et l'activation de FoxO1 via sa déphosphorylation pourrait donc servir de marqueur pour le stress oxydatif. Par ailleurs, le traitement de 24h à l'acide ascorbique amène une diminution de l'expression de l'*apoD*. Ce traitement est reconnu pour stimuler la prolifération des ostéoblastes, en agissant sur la synthèse de collagène et en régulant une multitude de gènes impliqués dans la croissance et la mort cellulaire, dans le métabolisme, la morphogenèse et la communication cellulaire des ostéoblastes (Carinci et al., 2005; Franceschi, 1992; Harada et al., 1991; Urban et al., 2012). Ainsi, cette diminution de l'expression de l'*apoD* suite aux traitements avec l'acide ascorbique pouvait être en lien avec son effet de stimulation de la prolifération. Il serait alors nécessaire de confirmer cet effet prolifératif par analyse de l'incorporation de BrdU. Ce dernier effet semblait en accord avec les travaux de Do Carmo et collègues indiquant que

l'expression génique de l'*apoD* est inversement reliée à la prolifération cellulaire (Do Carmo et al., 2007), ce qui nous a incité à étudier davantage cette relation dans les cellules MC3T3.

Afin d'établir la relation entre la prolifération cellulaire des ostéoblastes MC3T3 et le niveau d'expression de l'*apoD*, nous avons utilisé deux approches différentes : une condition de culture sans sérum désignée sevrage et une condition de culture à confluence. L'effet de l'absence de facteur de croissance provenant du sérum ainsi que celui de l'inhibition de contact à confluence sur la prolifération cellulaire a été vérifié par des analyses du cycle cellulaire et d'incorporation de BrdU. Le sevrage des cellules pendant 48h a amené une chute du nombre de cellules en phase G2/M et une chute de la synthèse d'ADN, confirmant la diminution du nombre de cellules en mitose, signe d'un arrêt de prolifération. Celui-ci a amené une augmentation significative de l'expression de l'*apoD*, ce qui est en accord avec les travaux de Do Carmo et al. (2007) qui ont rapporté une augmentation de l'expression de l'*apoD* suite à un sevrage de sérum. Le sevrage peut néanmoins être associé avec un stress de la cellule, ajoutant un facteur à celui de l'arrêt de prolifération. Ainsi, nous avons déterminé l'expression de l'*apoD* selon 3 stades de confluence afin de réduire la prolifération cellulaire suite à l'inhibition de contact et exclure le possible stress cellulaire occasionné par l'absence de sérum. Nos résultats indiquent que l'atteinte de la confluence amène bien une diminution de la prolifération cellulaire, tel que démontré par l'analyse du cycle cellulaire et de l'incorporation de BrdU (figure 4.3C et D). En effet, le nombre de cellules en phase G2/M, synonymes de prolifération, diminue reflétant une augmentation du nombre de cellules en phase G1. L'inhibition de prolifération n'est pas totale, puisque la lignée MC3T3 sécrète des facteurs de croissance de manière autocrine malgré l'absence de sérum. De plus, les ostéoblastes MC3T3 indiquent une augmentation de l'expression de l'*apoD* dans ces conditions de prolifération réduite (figure 4.3B), confirmant les résultats décrits précédemment et la littérature en situation d'arrêt prolifératif, généralement relié à un sevrage (Do Carmo et al., 2002; 2007; Provost et al., 1991). Il est à noter que l'analyse semi-quantitative de l'expression génique de l'*apoD* pourrait être confirmée par une analyse quantitative plus précise par PCR en temps réel.

Cette régulation de l'expression génique en situation d'arrêt prolifératif serait notamment due à la présence d'éléments de réponse au sérum dans le promoteur ainsi que

d'une séquence de purines-pyrimidines (« alternating purine-pyrimidine stretch » ou APP). En effet, la mutation ou la délétion d'une de ces séquences diminue voire inhibe l'augmentation d'expression de l'*apoD* généralement causée par l'arrêt de prolifération (Do Carmo et al., 2002). De plus, les études précédentes ont identifié que la prolifération était le paramètre principal dans la régulation de l'expression de l'*apoD* puisque l'ensemble des traitements tels les glucocorticoïdes (Simard et al., 1992), les hormones stéroïdes (Simard et al., 1991), l'acide rétinoïque (Lopez-Boado et al., 1994) et même le stress oxydatif (Do Carmo et al., 2007) induisaient tous un arrêt de prolifération.

La régulation de l'expression génique de l'*apoD* est régie par différents éléments interagissant avec les éléments de réponse de son promoteur. L'augmentation de l'expression de l'*apoD* en situation d'arrêt de prolifération suite à un sevrage de sérum serait associée à la kinase ERK1/2 (« extracellular-signal-regulated kinase ») (Levros Jr et al., 2010). Les travaux de Levros et al. démontrent en effet une perte de l'induction de l'expression d'*apoD* en situation d'arrêt de prolifération lorsque la voie MEK (MAPK kinase) est inhibée. Ce résultat est néanmoins surprenant puisque ERK1/2 fait partie d'une chaîne de « Mitogen-activated protein kinase » (MAPK) impliquée dans la prolifération cellulaire (Cobb, 1999; Hipkind et Bilbe, 1998; Levros Jr et al., 2010). En effet, l'activation de la voie MAPK via MEK amène la phosphorylation de ERK1/2 qui devient alors activé et qui phosphoryle à son tour d'autres protéines et facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes régulant la prolifération cellulaire. Il participe par exemple à l'inhibition de gènes antiprolifératifs (Meloche et Pouyssegur, 2007). De plus, son importance dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes a aussi été démontrée, puisque les cellules où ERK1/2 était inhibé présentaient des altérations au niveau de leurs fonctions. Cependant, le mécanisme, complexe, demeure peu défini (Lai et al., 2001; Raucci et al., 2008). Il serait donc pertinent d'étudier la régulation de ce facteur chez les ostéoblastes en lien avec l'expression de l'*apoD*, notamment lors d'un arrêt de prolifération.

De plus, la différenciation des ostéoblastes, permettant une formation osseuse et une minéralisation adéquate, s'accompagne d'un arrêt de prolifération, ce qui impliquerait une modulation de l'expression de l'*apoD* par celle-ci.

5.2 L'apoD et les ostéoblastes

Nous avons ainsi étudié l'expression de l'*apoD* en fonction de la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3, en stimulant cette dernière par un traitement à l'acide ascorbique et le β -glycérophosphate. Celui-ci augmente la différenciation des ostéoblastes, mesurable par dosage de l'activité enzymatique de l'ALP ainsi que par certains marqueurs des différents stades telle que l'ostéocalcine (Abed et al., 2011; Park, 2012). L'expression génique de l'*apoD* s'est avérée augmentée avec la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3. Puisque la différenciation des ostéoblastes commence après l'atteinte de confluence et donc l'arrêt de prolifération, nous pouvons affirmer que l'augmentation observée est associée au stade de différenciation. En effet, l'expression de l'*apoD* a été comparée à un stade dont la prolifération était déjà inhibée. Par contre, une comparaison avec l'expression génique de cellules non traitées/non différenciées permettrait de confirmer cette association. Nos résultats sont en accord avec les travaux d'Ishii et al. (2005), qui démontrent que les MSC expriment plus d'*APOD* suite à leur différenciation en ostéoblastes. Également, Lopez-Boado et al. (1994 et 1996) ont démontré que la différenciation de cellules humaines de cancer du sein induite par l'ajout d'acide rétinoïque ou de 1,25-dihydroxyvitamine D3 est liée à une augmentation de l'expression de l'*APOD*. Les ostéoblastes matures, responsables de la formation osseuse, exprimeraient donc l'*APOD* à des niveaux plus élevés, ce qui suppose un lien ou un rôle de l'*APOD* dans les fonctions de formation osseuse de ces cellules. Considérant que la protéine est généralement sécrétée (Annexe 1), ce rôle serait relié à sa capacité à lier des petites molécules hydrophobes, comme dans le transport d'hormones stéroïdes. Les oestrogènes par exemple, jouent un rôle important dans le métabolisme osseux. En effet, leur absence, notamment en situation de ménopause, amène une diminution de la formation osseuse, reliée à une augmentation de risque d'ostéoporose (Lerner, 2006).

Puisque l'*APOD/ApoD* est une protéine sécrétée et que son rôle serait attribué à ses fonctions paracrines, nous avons aussi étudié les effets de l'ajout d'*APOD* au milieu de culture. Nos résultats indiquent que les traitements avec l'*APOD* semble favoriser le passage

des cellules vers la phase G2, alors que la synthèse d'ADN n'est pas significativement affectée par l'ajout d'APOD au milieu de culture. Ce dernier résultat suggère que l'APOD circulante ne peut stimuler la prolifération cellulaire bien qu'elle favorise la transition entre les phases S et G2. Sarjeant et al. (2003) ont pour leur part trouvé que l'ajout d'APOD au milieu de culture de cellules de muscle lisse vasculaire inhibait l'augmentation de prolifération stimulée par le facteur de croissance PDGF (« platelet-derived growth factor »). Cette inhibition serait en lien avec ERK1/2, dont la translocation dans le noyau est inhibée, l'empêchant donc d'agir sur les facteurs de transcription nucléaires. Il est à noter que la phosphorylation d'ERK1/2 n'est pas affectée par l'ajout d'APOD (Sarjeant et al., 2003), ce qui indique la diversité possible des moyens de régulation par l'APOD. Il serait donc pertinent d'étudier et comparer ces voies, s'ajoutant à celle mentionnée dans la section 5.1. Parallèlement, le passage des cellules en phase G2 pourrait être relié au rôle protecteur de l'APOD/ApoD face aux stress. En effet, le cycle cellulaire comprend des points de contrôle qui s'assurent de l'intégrité de l'ADN avant la mitose et régulent donc la prolifération cellulaire face aux différents stimuli. Chaque étape du cycle comprend un point de contrôle et le passage en phase S puis G2 est régi par le complexe Cdk2/Cycline A1 (Kastan et Bartek, 2004). L'APOD/ApoD pourrait donc avoir une influence sur ce complexe, notamment sur son état de phosphorylation ou sur l'expression de la cycline A1, liens qu'il serait alors pertinent d'étudier.

Nous avons aussi déterminé l'effet de l'ajout d'APOD sur la différenciation ostéoblastique. L'ajout d'APOD dans le milieu de culture d'ostéoblastes pour des périodes de culture allant jusqu'à 21 jours a amené une augmentation de l'activité ALP. Cette enzyme, sécrétée par les ostéoblastes matures, participe à la formation de la matrice osseuse et est un indicateur de la différenciation ostéoblastique. L'ajout d'APOD aurait donc stimulé la différenciation des cellules MC3T3, comme celles des cellules d'ostéosarcome humain Saos-2 (Sasaki et al., 2009). Toutefois, le mécanisme demeure inconnu. La comparaison avec l'activité ALP dans des cellules non traitées à l'APOD serait nécessaire afin de confirmer que le résultat obtenu est bien associé à cet ajout. L'analyse de l'expression génique d'autres marqueurs des phases précoces et tardives de la différenciation permettrait d'affiner notre

connaissance à propos des mécanismes menant à l'augmentation de l'expression de l'*apoD* lors de la différenciation. En stipulant que l'augmentation de l'expression de l'*apoD* est accompagnée d'une augmentation de sa synthèse protéique et de sa sécrétion, celle-ci pourrait alors agir sur les ostéoblastes en stimulant leur différenciation, ce qui contribuerait à maintenir un niveau élevé d'*apoD*.

Le mécanisme par lequel l'ApoD influence les fonctions ostéoblastiques reste à être déterminé. Considérant que l'*apoD* lie une variété de petits ligands hydrophobes, l'effet de cette protéine sur les ostéoblastes pourrait impliquer sa capacité à favoriser leur transfert aux cellules. En effet, l'ApoD pourrait participer à l'entrée des composantes du milieu de culture ou du sérum ajouté au milieu de culture dans la cellule ostéoblastique. Le FBS contient des vitamines, des hormones, du cholestérol, figurant parmi les ligands de l'ApoD tel que mentionné dans le chapitre I. Parallèlement, le phénotype ostéoporotique des souris KO-*apoD* n'est retrouvé que chez les femelles et est accentué avec l'âge, montrant des similitudes avec la perte osseuse associée à la ménopause, suggérant que le rôle de l'ApoD pourrait être relié au métabolisme de l'œstrogène. Il serait alors intéressant d'étudier cette voie.

5.3 L'*apoD* dans les cultures primaires

Puisque les souris femelles déficientes en *apoD* démontrent un niveau de formation osseuse plus faible que celui des souris exprimant normalement l'*apoD*, nous avons initié des expériences préliminaires visant à étudier les fonctions des ostéoblastes issus de ces souris KO-*apoD*. Nos résultats indiquent que l'activité mitochondriale des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris KO-*apoD* est plus faible que les cellules issues de souris WT. Celle-ci est généralement reliée au nombre de cellules, donc à la viabilité cellulaire. Néanmoins en analysant cette activité sur une période de prolifération de 14 jours et en la comparant avec le stade initial, celle-ci est un bon indicateur du nombre croissant de cellules que l'on peut attribuer à la prolifération cellulaire. Ainsi la prolifération des ostéoblastes provenant de souris KO-*apoD* serait réduite. De plus lors des comptes cellulaires, le nombre

de cellules souches mésenchymales provenant des souris KO-*apoD* récoltées était réduit par rapport au nombre de cellules provenant des souris WT (données non présentées). Ainsi, ce taux réduit de prolifération semble déjà être présent aux niveaux des cellules souches mésenchymales. Il serait important donc de quantifier ces différences et d'approfondir l'étude des facteurs pouvant être impliqués.

Puisque l'APOD ne semblait pas avoir un effet direct sur la prolifération des cellules MC3T3, le résultat obtenu sur les ostéoblastes en culture primaire pourrait être dû à un impact indirect de la déficience en *apoD*, notamment sur les fonctions ostéoblastiques et les facteurs impliqués dans la prolifération. Considérant que nos résultats indiquent que l'ajout d'APOD au milieu de culture favorise la transition des cellules vers la phase G2/M, la régulation du cycle cellulaire des ostéoblastes déficients pour l'*apoD* pourrait être altérée et avoir un impact sur leur prolifération et leur viabilité. Ces différences de prolifération ont d'ailleurs compliqué les tentatives de comparer la différenciation ostéoblastique via le dosage de l'activité ALP. Les cultures primaires issues de souris KO-*apoD* poussant moins vite que celles provenant de souris WT, elles n'atteignaient pas la confluence en même temps et n'étaient donc pas prêtes pour le traitement de différenciation au même moment, ce qui amenait un biais dans la comparaison de l'activité ALP.

Il serait important d'étendre l'étude de la régulation de l'expression génique de l'*apoD* et des fonctions ostéoblastiques sous l'influence de la protéine sur des ostéoblastes en culture primaire afin de confirmer ces résultats avec un modèle plus fidèle à la réalité. De plus, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'ajout d'APOD au milieu de culture d'ostéoblastes provenant de souris KO-*apoD* ou leur transfection avec un vecteur d'expression de l'ApoD, afin de voir si les résultats se rapprochent de ceux obtenus avec les ostéoblastes provenant de WT. Ceci permettrait de confirmer le rôle de la déficience en *apoD* dans les résultats observés précédemment. Parallèlement, nous pourrions étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de l'*apoD* par siRNA dans les cellules issues de souris WT ou dans les lignées cellulaires. Ceci permettrait de vérifier si le rôle de l'ApoD dans le phénotype ostéoporotique observé est directement lié à la formation osseuse réduite et si celle-ci est uniquement attribuée à la déficience en *apoD*, ou si ce phénotype est dû à un effet systémique.

Finalement, une comparaison avec les fonctions ostéoblastiques des cellules issues de souris mâles déficientes en *apoD* serait aussi nécessaire.

5.4 L'*apoD* dans les lignées humaines

Puisque nos résultats indiquent que les ostéoblastes murins expriment l'*apoD*, nous étions intéressés à documenter son expression génique dans les ostéoblastes humains à titre de comparaison. Celle-ci a pu être détectée dans les cellules ostéoblastiques humaines MG63 et dans les cellules ostéoblastiques U2OS. L'efficacité des amorces a été confirmée par un contrôle positif et la qualité et la quantité d'ARN ont été confirmées par comparaison avec le gène de référence *GAPDH*. Ces lignées expriment donc l'*APOD* comme les lignées ostéoblastiques murines. Il est à noter que les travaux de Sasaki et al. (2009) ont indiqué que l'expression de l'*apoD* est p53-dépendante. Néanmoins, les cellules MG-63 sont déficientes pour p53 (Wang et al., 2012), et les cellules U2 OS sont compétentes pour p53 (Yuan et al., 2007), et présentent tous deux une expression génique de l'*apoD*. Ces résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes sur l'expression et le rôle de l'*APOD* dans le métabolisme osseux humain.

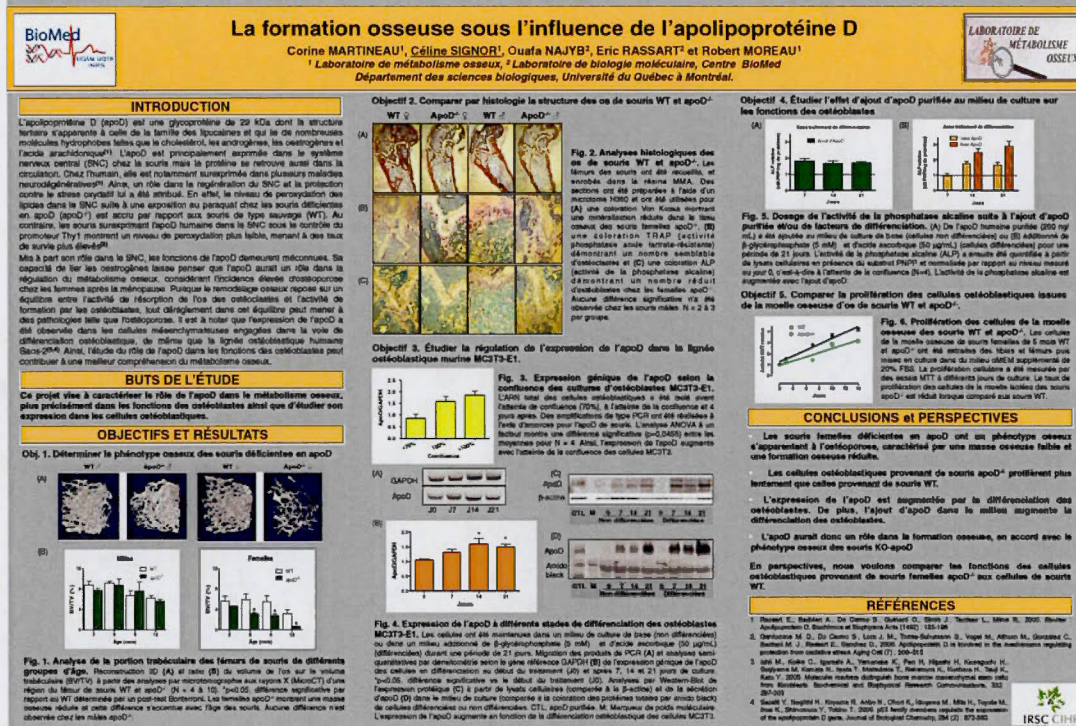
CHAPITRE VI : CONCLUSION

Cette étude a donc permis d'élaborer des pistes d'analyse sur le rôle et la régulation de l'expression génique de l'apolipoprotéine D. Ainsi, cette expression est, pour la première fois, retrouvée dans la lignée ostéoblastique murine MC3T3. La régulation de cette expression diffère de celle retrouvée dans les autres modèles cellulaires, considérant la spécificité des fonctions ostéoblastiques. Néanmoins, la relation inverse entre l'état prolifératif et l'expression génique de l'*apoD* est retrouvée, les ostéoblastes surexprimant le gène lorsqu'ils sont en arrêt de croissance, provoqué par privation de sérum ou par l'inhibition de contact due à l'atteinte de confluence; cet état étant confirmé par analyses du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN. Parallèlement, en concordance avec ce résultat, l'expression génique de l'*apoD* augmentait avec le stade de différenciation ostéoblastique, suggérant ainsi un rôle à l'ApoD dans la formation osseuse, réalisée par les ostéoblastes matures. La différenciation ostéoblastique étant enclenchée après un arrêt de prolifération, ces deux rôles pourraient donc agir via la même voie de signalisation. Cependant, l'ApoD étant une protéine sécrétée, il serait donc important de confirmer, par immunobuvardage par exemple (Western Blot) que les niveaux de synthèse de la protéine suivent le niveau d'expression génique détecté par RT-PCR et de comparer les niveaux protéiques retrouvés dans les lysats cellulaires avec le niveau de protéine sécrétée dans le milieu.

Finalement, les cultures primaires d'ostéoblastes issues de souris déficientes en *apoD* sont un bon modèle qui permettrait de mieux déterminer l'importance de l'ApoD dans les

fonctions ostéoblastiques, qui peuvent être étudiées en analysant l'expression génique de marqueurs de différenciation ou par analyse de la minéralisation. Parallèlement, l'analyse de la régulation de l'expression génique de l'*apoD* par les différentes conditions pourra être réalisée sur les lignées cellulaires humaines, considérant que l'ApoD pourrait avoir un rôle important à jouer dans le métabolisme osseux et donc éventuellement dans le traitement de pathologies telles que l'ostéoporose.

APPENDICE A



BIBLIOGRAPHIE

- Abed E, Martineau C, Moreau R., 2011. Role of melastatin transient receptor potential 7 channels in the osteoblastic differentiation of murine MC3T3 cells. *Calcif Tissue Int*, 88(3): 246-53.
- Ambrogini E, Almeida M, Martin-Millan M, Paik JH, Depinho RA, Han L, Goellner J, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC., 2010. FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metabolism*, 11(2):136-46.
- Aspinall J.O., Bentel J.M., Horsfall D.J., Haagensen D.E., Marshall V.R., Tilley W.D., 1995. Differential expression of apolipoprotein D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *Journal of Urology*, 154 (2) : 622-628.
- Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, Cheng BL, Luo SQ. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17497-506.
- Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martín-Tejedor E, Sanchez D., 2011. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia*, 59 (10) : 1551-66.
- Balbin M., Freije J.M., Fueyo A., Sanchez L., Lopez-Otin C., 1990. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast cystic disease. *Biochemistry Journal*, 271: 803-807.
- Bilezikian J.P., Raisz L.G., Martin T.J., 2002. *Principles of Bone Biology*, volume 1. Academic Press, deuxième édition, 1744 pages.
- Brantus J-F., Meunier P-J., 2005. *L'ostéoporose*. Elsevier Masson. 227 pages.

- Carinci F., Pezzetti F., Spina A.M., Palmieri A., Laino G., De Rosa A., Farina E., Illiano F., Stabellini G., Perrotti V., Piattelli A., 2005. Effect of Vitamin C on pre-osteoblast gene expression. *Arch Oral Biol*, 50(5):481-96.
- Charron IB, Ouellet F, Houde M, Sarhan F. 2008. The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biology*, 8: 86.
- Chen G., Deng C., Li Y.P., 2012. Review: TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Science*, 8(2): 272-288.
- Cobb MH., 1999. MAP kinase pathways. *Progress in biophysics and biophysical chemistry*. 71(3-4): 479-500.
- DeLuca H.F., 2004. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *American Journal of Clinical Nutrition*; 80(6 Suppl) :1689S-96S.
- Dilley W.G., Haagensen D.E., Cox C.E., Wells S.A., 1990. Immunology and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Research and Treatment*, 16: 253-260.
- Do Carmo S., Seguin D., Milne R., Rassart E., 2002. Modulation of apolipoprotein and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem* (277): 5514–5523.
- Do Carmo S., Levros L-C Jr., Rassart E., 2007. Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* (1773) : 954-969.
- Do Carmo S., Jacomy H., Talbot P. J., Rassart E., 2008. Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *Journal of Neuroscience*, 28 (41) : 10330-10338.
- Drayna D., Fielding C., McLean J., Bear B., Castro G., Chen E., Comstock L., Henzel W., Kohr W., Rhee L., Wion K., Lawn R., 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 (35) 16535-16539.
- Drayna D.T., McLean J.W., Wion K.L., Trent J.M., Drabkin H.A., Lawn R.M., 1987a. Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA*, 6(3): 199-204.

- Drayna D., Scott J.D., Lawn R, 1987b. Multiple RFLPs at the human apolipoprotein D (ApoD) locus. *Nucleic Acids Research*, 15 (22): 9617.
- Eichinger A., Nasreen A., Kim H.J., Skerra A., 2007. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *Journal of Biological Chemistry* 282(42):31068-75.
- Flower D. R., 1996. Review article, The lipocalin protein family : structure and function. *Biochem J.* 318 : 1-14.
- Franceschi R.T., Iyer B.S., 1992. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone Mineral Research*, 7(2) : 235-46.
- Franz-Odenaal T.A., Hall B.K., Witten P.E., 2005. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* Oct 28.
- Ganfornina M. D., Do Carmo S., Lora J. M., Torres-Schumann S., Vogel M., Allhorn M., González C., Bastiani M. J., Rassart E., Sanchez D., 2008. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* (7) : 506-515.
- Goessling W., Zucker S.D., 2000. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *American Journal of Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279 : G356-G365.
- Harada S, Matsumoto T, Ogata E., 1991. Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 6(9):903-8.
- Hippskind RA, Bilbe G., 1998. MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci.* 3:804-16.
- Hull-Thompson J., 2009. Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz. *PLoS Genet.* 2009 Apr;5(4):e1000460.
- Ishii M., Koike C., Igarashi A., Yamanaka K., Pan H, Higashi H, Kawaguchi H., Sugiyama M, Kamata N., Iwata T., Matsubara T., Nakamura K., Kurihara H., Tsuji K., Kato Y., 2005. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332 : 297-303.
- Iu M.F., Kaji H., Sowa H., Naito J., Sugimoto T., Chihara K., 2005. Dexamethasone

suppresses Smad3 pathway in osteoblastic cells. *Journal of Endocrinology*, 185 : 131-138.

- Kastan M.B. et Bartek J., 2004. Cell-cycle checkpoint and cancer. *Nature*, 432 : 316-323.
- Kini U. et Nandeesh B.N., 2012. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer Berlin Heidelberg. P.29-57.
- Khurana J.S., 2009. *Bone Pathology*. 2^{ème} édition Humana Press. 416 pages.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Khishimoto T., 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation swing of maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89 (5) : 755-764.
- Komori T., 2006. Regulation of oestoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular Biochemistry*, 99 (5) : 1233-1239.
- Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL., 2001. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17):14443-50.
- Lambert, J., Provost, P.R., Marcel, Y.L., Rassart, E. 1993. Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1172: 190-192.
- Lerner U.H., 2006. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *Journal of Dental Research*, 85 (7): 584-595.
- Levros L.C. Jr., Do Carmo S, Edouard E, Legault P, Charfi C, Rassart E., 2010. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: Implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta*, 1803(9):1062-71.
- Li H, Qian W, Weng X, Wu Z, Li H, Zhuang Q, Feng B, Bian Y. Glucocorticoid receptor and sequential P53 activation by dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *PLoS One*. 2012; 7(6):e37030.
- Li M, Zhao L, Liu J, Liu AL, Zeng WS, Luo SQ, Bai XC. 2009. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. *Anat Rec (Hoboken)*. 292(8): 1107-13.

- Lopez-Boado Y.S., Tolivia J., Lopez-Otin C. 1994. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (43): 26871-26878.
- Lopez-Boado Y.S., Klaus M., Dawson M., Lopez-Otin C., 1996. Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RAR-dependent signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (50): 32105-32111.
- Marieb E.N., 2005. Anatomie et physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., troisième édition, 1288 pages.
- Martinez E., Navarro A, Ordóñez C, Del Valle E, Tolivia J., 2013. Oxidative stress induces apolipoprotein D overexpression in hippocampus during aging and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 36(1):129-44
- McConathy W.J., Alaupovic P., 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D : a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Letters*, 27 (2) : 178-182.
- Meloche S., Pouyssegur J., 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26, 3227–3239.
- Meunier P.J., Brantus J.F., Chapurlat R., Chevrel G., Fontanges E. et Vignot E., 2005. L'ostéoporose. 3ème édition Masson. 227 pages.
- Morais-Cabral J.H., Atkins G.L., Sanchez L.M., Lopez-Boado Y.S., Lopez-Otin C., Sawyer L., 1995. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D : implications for the protein's function. *FEBS Letters*, 366 : 53-56.
- O'Brien C.A., Jia D., Plotkin L.I., Bellido T., Powers C.C., Stewart S.A., Manolagas SC, Weinstein RS. 2004. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*.145(4):1835-41.
- Okazaki R., Inoue D., Shibata M., Saika M., Kido S., Ooka H., Tomiyama H., Sakamoto Y., Matsumoto T., 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*, 143 (6) :

2349-2356.

- Park J.B., 2012. The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression. *Journal of Surgical Research*, 173 (1) : 99-104.
- Peitsch M.S., Boguski M.S., 1990. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein ? *New Biology*, 2 (2) 197-206.
- Provost P. R., Marcel Y. L., Milne R. W., Weech P. K., Rassart E., 1991. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *Federation of European Biochemical Societies* (290) : 139-141.
- Rached M-T., Kode A., Xu A., Yoshikawa Y., Paik J-H., DePinho R.A., Kousteni S., FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metabolism*. (11) : 147-160.
- Rassart E., Bedirian A., Do Carmo S., Guinard O., Sirois J., Terrisse L., Milne R., 2000. Review : Apolipoprotein D. *Biochimica et Biophysica Acta* (1482) : 185-198.
- Raucci A, Bellostà P, Grassi R, Basilico C, Mansukhani A., 2008. Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways. *J Cell Physiol*. 215(2): 442-51
- Rauch A., Seitz S., Baschant U., Schilling A.F., Illing A., Stride B., Kirilov M., Mandic V., Takacz A., Schmidt-Ullrich R., Ostermay S., Schinke T., Spanbroek R., Zaiss M.M., Angel P.E., Lerner U.H., David J.P., Reichardt H.M., Amling M., Schütz G., Tuckermann J.P., 2010. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metabolism*, 11(6):517-31.
- Santé Canada, site internet. [<http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/diseases-maladies/seniors-aines-ost-fra.php>] Mis à jour en octobre 2007.
- Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, Prichett W, Veinot JP, Rassart E, Rabinovitch M. , 2003. Apolipoprotein D Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-BB!Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferated by Preventing Translocation of Phosphorylated Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 to the Nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(12):2172-7.

- Sasaki Y., Negishi H., Koyama R., Anbo N., Ohori K., Idogawa M., Mita H., Toyota M., Imai K., Shinomura Y., Tokino T., 2009. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (2) : 872-883.
- Séguin D., Desforges M., Rassart E., 1994. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Molecular Brain Research* 30 (2) : 242-250.
- Servier Medical Art, Site internet : <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank> consulté le 2 septembre 2013.
- Simard J., Dauvoix S., Haagensen D.E., Levesque C., Merand Y., Labrie F., 1990. Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDFP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology*, 126 (6): 3223-3231.
- Simard J., De Launoit Y., Haagensen D.E., Labrie F., 1992. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130 (3): 1115-1121.
- Simard J., Veilleux Y., De Launoit Y., Haagensen D.E., Labrie F., 1991. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research*, 51 (16) : 4336-4341.
- Spreyer P., Schaal H., Kuhn G., Rothe T., Unterbeck A., Oleck K., Muller H.W., 1990. Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *The EMBO Journal*, 9 (8): 2479-2484.
- Terrisse L., Poirier J., Bertrand P., Merched A., Visvikis S., Siest G., Milne R., Rassart E., 1998. Increased Levels of Apolipoprotein D in Cerebrospinal Fluid and Hippocampus of Alzheimer's Patients. *Journal of neurochemistry*, 71 (4): 1643-1650.
- Urban K., Höhling H.J., Lüttenberg B., Szuwart T., Plate U., 2012. An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. *Head Face Medicine*, 8:25.
- Walker D.W., Muffat J., Rundel C., Benzer S., 2006. Overexpression of a Drosophila homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr. Biology*, 16: 674-679.

- Walsh S., Jordan G.R., Jefferiss C., Stewart K., Beresford J.N., 2001. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*, 40 (1): 74-83.
- Wang Y, Wei Y, Zhang H, Shi Y, Li Y, Li R., 2012. Arsenic trioxide induces apoptosis of p53 null osteosarcoma MG63 cells through the inhibition of catalase. *Med Oncol*. 29(2):1328-34.
- Weech P.K., Provost P., Tremblay N.M., Camato R.N., Milne R.W., Marcel Y.L., Rassart E., 1991. Apolipoprotein D – An atypical apolipoprotein. *Prog. Lipid Res* (30) : 259-266.
- Yamaguchi A., Komori T., Suda T., 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs and Cbfa1. *Endocrine Reviews*, 21(4) : 393-411.
- Yang C.Y., Gu Z.W., Blanco-Vaca F., Gaskell S.J., Yang M., Massey J., Gotto A.M., Pownall H.J., 1994. Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33 (41): 12451-12455.
- Yuan XW, Zhu XF, Huang XF, Sheng PY, He AS, Yang ZB, Deng R, Feng GK, Liao WM, 2007. Interferon-alpha enhances sensitivity of human osteosarcoma U2OS cells to doxorubicin by p53-dependent apoptosis. *Acta Pharmacol Sin.*,28(11):1835-41